

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Sección de Químicas.



TESIS DOCTORAL

**Metabolismo y composición de glicerolípidos y ácidos grasos
en tejidos adultos y fetales de conejo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Carmen Acebal Sarabia

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Serie A-n.º 226

SECCION DE QUIMICAS

BIBLIOTECA UCM



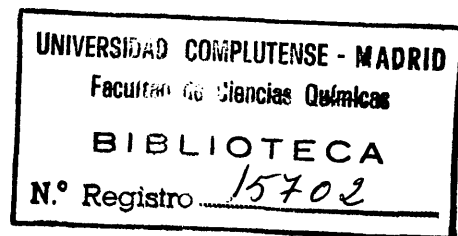
5303530560

**METABOLISMO Y COMPOSICION
DE GLICEROLIPIDOS Y ACIDOS GRASOS
EN TEJIDOS ADULTOS
Y FETALES DE CONEJO**

TESIS DOCTORAL

por

CARMEN ACEBAL SARABIA



**Publicaciones de la Facultad de Ciencias
MADRID, 1975**

ISBN-84-600-1790-7

Depósito Legal: M. 9.691 - 1975

Impreso por el Servicio de Publicaciones de la Facultad de Ciencias
Universidad Complutense de Madrid

El presente trabajo se ha llevado a cabo en los Laboratorios del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del profesor D. Angel Martin Municio, a quien va dirigido mi agradecimiento por su valiosa ayuda.

I N D I C E

1. PARTE TEORICA

	<u>Página</u>
1.1 INTRODUCCION	11
1.2 BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS	13
1.2.1 Biosíntesis "de novo"	13
1.2.2 Síntesis mitocondrial	15
1.2.3 Síntesis microsomal	16
1.2.4 Síntesis de ácidos grasos insaturados	17
1.3 BIOSINTESIS DE TRIGLICERIDOS Y FOSFOLIPIDOS	18
1.3.1 Mecanismo de biosíntesis "de novo"	18
1.3.2 Mecanismo de desacilación-reacilación	21
1.3.3 Mecanismo de metilación	24
1.3.4 Mecanismo de intercambio de bases nitrogenadas ...	25
1.4 INFLUENCIA DE DIETA Y HORMONAS SOBRE LA COMPOSICION Y DISTRIBUCION DE ACIDOS GRASOS EN LIPIDOS	26
1.5 METABOLISMO DE LOS LIPIDOS PLASMATICOS	28
1.5.1 Síntesis hepática de lipoproteínas	28
1.5.2 Síntesis de lipoproteínas en la mucosa intestinal..	29
1.5.3 Catabolismo de quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad	30
1.5.4 Catabolismo de lipoproteínas de elevada y baja densidad	32
1.6 REGULACION DEL METABOLISMO LIPIDICO	33
1.6.1 Aspectos generales del flujo de triglicéridos y su regulación	33
1.6.2 Regulación de la lipólisis	36
1.6.3 Acciones de la insulina sobre el metabolismo li- pídico	39
1.6.3.1 Efecto sobre los niveles de lípidos plasmáticos	39
1.6.3.2 Efecto sobre la síntesis hepática de ácidos grasos	40
1.6.3.3 Efecto sobre la síntesis de triglicé- ridos de hígado de plasma	42
1.6.3.4 Efecto sobre la utilización de trigli- céridos plasmáticos	42
1.7 INFLUENCIA DE LA GESTACION SOBRE EL METABOLISMO DE LIPIDOS	44
1.7.1 Modificaciones cuantitativas de los lípidos plasmáticos	44

1.7.2	Influencias hormonales	46
1.7.3	Biosíntesis de lípidos	50
1.7.4	Acidos grasos de plasma y tejido adiposo	52
1.8	PERMEABILIDAD DE LA PLACENTA. ORIGEN DE LOS LIPIDOS FETALES	54
1.8.1	Origen de los triglicéridos fetales	56
1.8.2	Origen del colesterol fetal	57
1.8.3	Origen de los fosfolípidos fetales	58
1.8.4	Origen de los ácidos grasos libres fetales	60
1.8.5	Origen de las lipoproteínas del plasma fetal	62
1.9	ESTUDIOS SOBRE LAS RELACIONES HORMONALES ENTRE MADRE Y FETO	62
1.10	METABOLISMO LIPIDICO FETAL	65
1.10.1	Importancia del metabolismo de lípidos para el feto	65
1.10.2	Concentración de lípidos y composición de ácidos grasos durante el desarrollo	65
1.10.3	Biosíntesis de lípidos	68
1.10.4	Degradación de lípidos	72
1.10.5	Influencias hormonales durante el desarrollo fetal	73

2. MATERIALES Y METODOS

2.1	MATERIAL BIOLOGICO	81
2.2	ADMINISTRACION DE INSULINA	81
2.3	ANALISIS CUANTITATIVO DE LIPIDOS DE SUERO	82
2.3.1	Aislamiento de lípidos totales	82
2.3.2	Cromatografía en capa fina	84
2.3.3	Análisis cuantitativo de fosfolípidos	85
2.3.3.1	Análisis de clases de fosfolípidos	85
2.3.3.2	Análisis de fosfolípidos totales	88
2.3.4	Análisis cuantitativo de triglicéridos	89
2.3.5	Análisis cuantitativo de ácidos grasos libres ...	90
2.3.6	Análisis cuantitativo de colesterol total	90
2.3.7	Análisis de lipoproteínas	91
2.4	EXTRACCION DE LIPIDOS TOTALES DE TEJIDOS	91
2.4.1	Separación cromatográfica de los lípidos totales de tejidos	92
2.5	ANALISIS DE ACIDOS GRASOS TOTALES Y DE TRIGLICERIDOS Y FOSFOLIPIDOS DE TEJIDOS. OBTENCION DE ESTERES METILICOS Y ANALISIS	93
2.6	HIDROLISIS ENZIMATICA DE FOSFOLIPIDOS PARA ESTUDIAR LA DISTRIBUCION POSICIONAL DE ACIDOS GRASOS	95

2.7	HIDROLISIS DE TRIGLICERIDOS CON LIPASA PANCREATICA PARA ESTUDIAR LA DISTRIBUCION PARCIAL DE ACIDOS GRASOS...	97
2.8	CINETICA DE TRIGLICERIDOS Y FOSFOLIPIDOS	99
2.8.1	Extracción y funcionamiento de lípidos	100
2.9	BIOSINTESIS DE LIPIDOS A PARTIR DE VARIOS SUSTRATOS RADIATIVOS	101
2.9.1	Preparación de homogeneizados	101
2.9.2	Preparación de las incubaciones	102
2.9.3	Preparación de las muestras radiactivas para radio CLG	103
2.9.4	Medidas de radiactividad por centelleo líquido	104
2.9.5	Medida de actividad de acetil-CoA ligasa	105
2.9.6	Determinación de niveles de acil-CoA ésteres	106
2.10	VALORACION DE PROTEINAS	107

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1	EVOLUCION CUANTITATIVA DE DIFERENTES CLASES DE LIPIDOS DE SUERO DE CONEJO DURANTE LA GESTACION Y ADMINISTRACION DE INSULINA	111
3.2	COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE LIPIDOS TOTALES, TRIGLI- CERIDOS Y FOSFOLIPIDOS DE HIGADO DE CONEJOS. VARIACIONES CUANTITATIVAS PRODUCIDAS POR LA GESTACION Y ADMINISTRA- CION DE INSULINA	120
3.3	DISTRIBUCION DE ACIDOS GRASOS EN FOSFATIDILCOLINA DE HIGADO Y PULMON DE CONEJOS ADULTOS NORMALES, GESTANTES Y FETOS	127
3.4	DISTRIBUCION DE ACIDOS GRASOS EN FOSFATIDILETANOLAMINA DE HIGADO Y PULMON DE CONEJOS ADULTOS NORMALES, GESTAN- TES Y FETOS	134
3.5	EFEECTO DE LA GESTACION SOBRE LA DISTRIBUCION PARCIAL DE ACIDOS GRASOS EN TRIGLICERIDOS DE HIGADO Y PULMON DE CONEJOS ADULTOS. COMPOSICION DE TRIGLICERIDOS DE HIGA- DO Y PULMON FETALES	141
3.6	CINETICA DE GLICERIDOS PLASMATICOS EN CONEJOS. INFLUEN- CIA DE LA GESTACION Y ADMINISTRACION DE INSULINA.....	148
3.7	INCORPORACION DE ACIDOS GRASOS POR HOMOGENEIZADOS DE HIGADO DE CONEJAS CONTROL, GESTANTE Y FETO	154

4.	CONCLUSIONES	163
5.	BIBLIOGRAFIA	173

1. P A R T E T E O R I C A .

1.1 INTRODUCCION

Los lípidos constituyen un conjunto complejo de sustancias, la mayor parte de las cuales pueden hallarse en forma de especies moleculares diferentes, según la naturaleza y distribución de sus ácidos grasos componentes. Entre las diferentes funciones que los lípidos desempeñan en el organismo se pueden señalar como fundamentalmente importantes, el constituir los principales depósitos de reserva intracelulares desde el punto de vista energético, ser una forma de transporte de combustible metabólico y desempeñar una misión estructural en las membranas celulares. Algunas sustancias pertenecientes al grupo de los lípidos poseen una actividad biológica intensa, como son algunas vitaminas y sus precursores, así como un cierto número de hormonas.

Hasta hace pocos años la bioquímica de los lípidos fue considerada un campo poco interesante y de complejidad difícilmente abordable. Sin embargo, el perfeccionamiento de diversas técnicas de análisis supuso un avance importante hacia un estudio y conocimiento mas profundos del significado biológico de estas sustancias.

Es bien sabido que la gestación induce cambios importantes a nivel del metabolismo intermediario, y es claro que, un conocimiento preciso de la naturaleza e intensidad de las variaciones metabólicas que se producen durante la gestación no sólo tiene un interés científico sino eminentemente práctico. En efecto, ya que el metabolismo intermediario es el índice más preciso de la condición biológica en que se encuentra una célula, un tejido, o un organismo, se comprende como, sólo cuando se tengan conocimientos exactos sobre los diferentes aspectos metabólicos durante la gestación, se podrá atribuir a dicho estado una significación fisiológica más clara y se encontrará, probablemente, la solución a mu

chos problemas patológicos.

Si se considera que la reserva energética de un organismo está constituida casi por entero por los lípidos de depósito y que el tejido adiposo tiene una actividad metabólica muy intensa resulta evidente como, durante el curso de la gestación, a las mayores necesidades funcionales de órganos y tejidos así como a un aumento del presupuesto calórico, deberá corresponder una modificación adecuada del intercambio lipídico.

Debemos admitir, por tanto, que durante la gestación, se modifica el metabolismo de las grasas no sólo en aspectos generales sino en puntos muy concretos y diversos.

Teniendo en cuenta que el metabolismo de hidratos de carbono y el de lípidos se encuentran en íntima y recíproca relación, las variaciones glicometabólicas, que sin duda acompañan a la gestación, constituyen una prueba indirecta pero convincente de la existencia, durante dicho estado, de particulares modificaciones en el metabolismo lipídico. De hecho, determinadas anomalías patológicas, clásicamente atribuidas a un error en el metabolismo de hidratos de carbono, se ha visto recientemente que son consecuencia de alteraciones concretas a nivel de intercambio lipídico.

No hay que olvidar tampoco, que muchas de las modificaciones que ocurren durante la gestación tienen su origen en alteraciones del sistema endocrino materno. Es un problema frecuente el predecir los efectos sobre el feto de diferentes trastornos endocrinos de la madre, lo que requiere el conocimiento de las relaciones hormonales materno-fetales. Además de los órganos endocrinos de la madre y del feto el otro elemento esencial es la placenta, que además de regular el intercambio de sustancias entre las circulaciones materna y fetal, es un órgano primordial en la producción de hormonas, muchas de ellas de naturaleza lipolítica.

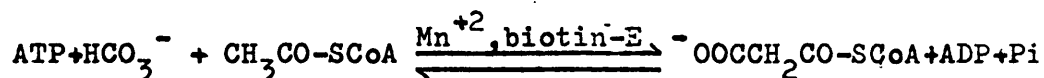
Un aspecto muy interesante del estudio del metabolismo de lípidos a lo largo del desarrollo lo constituyen los fosfolípidos pulmonares, sobre todo, desde que hace pocos años se descubrió que una lecitina, la dipalmitoil-3-sn-fosfatidilcolina es la responsable de las características de actividad superficial del pulmón y que su aparición en el órgano fetal tiene lugar en las últimas etapas del desarrollo, cuando se hacen operativas las rutas de biosíntesis que conducen a la formación del mencionado fosfolípido; y en relación con esto, es un hecho demostrado que la principal causa de mortalidad de fetos prematuros se debe a una inmadurez pulmonar, cuya característica principal es la ausencia, o baja concentración de la dipalmitoil lecitina.

1.2 BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS.

1.2.1 BIOSINTESIS "DE NOVO".

En una gran variedad de sistemas biológicos, la biosíntesis "de novo" de ácidos grasos en la fracción soluble del citoplasma está catalizada por dos sistemas enzimáticos, acetil-CoA carboxilasa y ácido graso sintetasa, que actúan de modo secuencial. El esqueleto carbonado de los ácidos grasos que se biosintetizan por este mecanismo procede en su totalidad de acetil-CoA.

La acetil-CoA carboxilasa cataliza la primera etapa en la síntesis de ácidos grasos a partir de acetil-CoA, que es una típica reacción de carboxilación dependiente de biotina (Vagelos, 1964)



Esta enzima ha sido aislada y purificada en una gran variedad de tejidos animales, plantas, levadura y varios microorganismos. En las células animales la enzima se localiza en el citoplasma, aun

que se ha sugerido su asociación a microsomas de hígado de paloma (Margolis y Baum, 1.966) y glándula mamaria de conejo lactante (Easter y Dils, 1.968).

La ácido graso sintetasa cataliza la secuencia de reacciones que conducen a la síntesis completa de los ácidos grasos a partir de malonil-CoA. Este sistema enzimático, descubierto inicialmente en levadura por Lynen (1.961) bajo la forma de complejo multienzimático, ha sido aislado posteriormente de diversos tejidos animales, plantas superiores y microorganismos, bajo la forma de complejos enzimáticos que catalizan reacciones de la misma naturaleza, si bien presentan ciertas diferencias en su organización estructural y propiedades moleculares.

El conocimiento de las reacciones catalizadas por estos complejos enzimáticos ha sido posible gracias sobre todo al estudio de sistemas bacterianos, en los cuales el sistema enzimático está disociado en sus proteínas individuales, a diferencia de los complejos fuertemente asociados de levadura y organismos superiores. Vagelos y col. (Goldman et al., 1.963; Majerus y Vagelos, 1.964; Majerus et al., 1.965) aislaron del sistema enzimático de *E. coli* una proteína termoestable de bajo peso molecular a la que denominaron "proteína portadora de acilo" (ACP), que es el componente central del complejo, y a ella se unen los grupos acilo de los intermediarios a través del resto 4'-fosfopanteteína del ACP formando enlaces tioester. Así se pudo establecer la secuencia de reacciones intermedias de la biosíntesis de ácidos grasos en este microorganismo (Wakil et al., 1.964; Vagelos et al., 1.966).

En *E. coli*, lo mismo que en la mayor parte de los sistemas enzimáticos de animales y plantas, el ácido graso que resulta en la biosíntesis "in vitro" es ácido palmítico, que se separa por acción de una tioesterasa. Sin embargo, el mecanismo de terminación no es general para todos los sistemas. Así, en *E. coli* "in vivo" el palmitil-S-ACP reacciona directamente con glicerol-3-P por acción de una aciltransferasa específica localizada

en la membrana, formando ácido lisofosfatídico, el primer intermediario en la biosíntesis de fosfolípidos (Van den Bosch y Vagelos, 1.970). En levaduras, el ácido graso se transacila con CoA, mientras que en hígado de paloma existe actividad tioesterásica unida a la sintetasa (Phillips et al., 1.970).

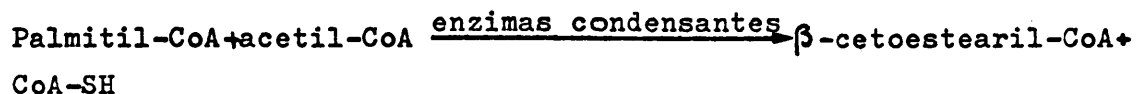
1.2.2 SINTESIS MITOCONDRIAL.

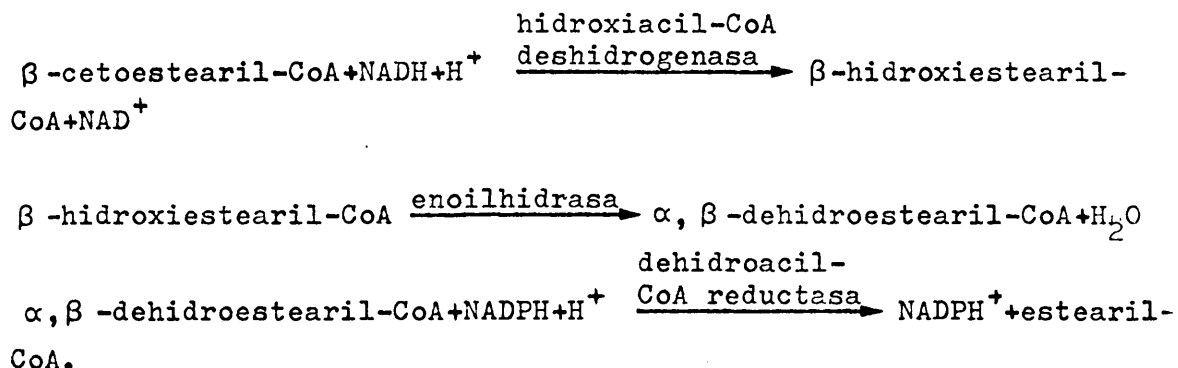
Harlan y Wakil (1.963) han descrito que la síntesis de ácidos grasos en mitocondrias tiene lugar al menos por dos mecanismos. El primero, en el que malonil-CoA actúa como intermediario, es idéntico a la síntesis "de novo" que tiene lugar en el sobrenadante citoplásmico y es también sensible a avidina, al igual que la acetil-CoA carboxilasa. El segundo sistema es un mecanismo de elongación y constituye el clásico mecanismo de síntesis mitocondrial en contraste con el mecanismo de condensación a menudo llamado "mecanismo citoplasmático", una parte del cual es también realizable en mitocondrias.

En las mitocondrias, la incorporación de acetil-¹⁴C-CoA en ácidos grasos de cadena larga saturados e insaturados tiene lugar en presencia de ATP, NADH y NADPH. A diferencia del mecanismo citoplasmático, la presencia de bicarbonato no es esencial para este proceso (Harlan y Wakil, 1.963) porque en él no se utiliza malonil-CoA y por esta razón tampoco influye la avidina.

El mecanismo mitocondrial es una inversión de la β -oxidación, excepto que se requiere NAD para el paso final en lugar de FAD (Langdon, 1.957).

Las ecuaciones para el sistema de elongación pueden escribirse :





Este esquema presupone que la presencia de ambos tipos de nucleotidos es necesaria para obtener el máximo de síntesis (Wakil, 1.963). Además, la síntesis de ácidos grasos por elongación requiere fosfato de piridoxal.

1.2.3 SINTESIS MICROSOMAL.

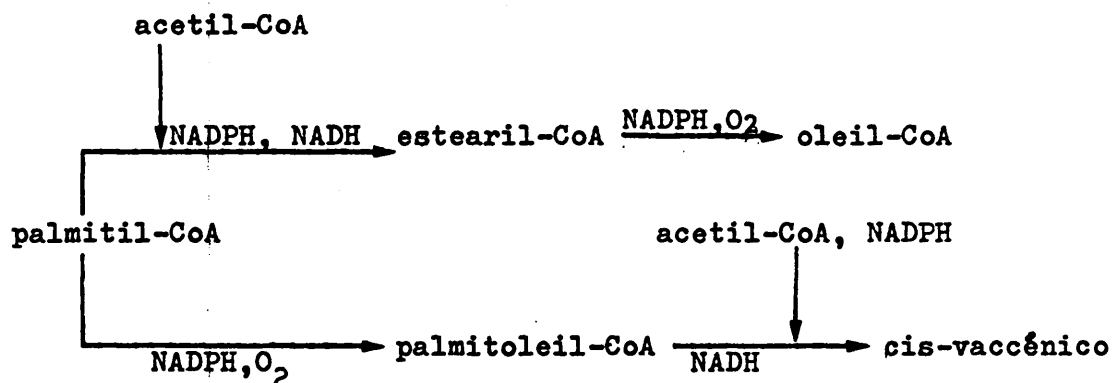
Además de los dos mecanismos clásicos de síntesis de ácidos grasos saturados, es decir, por condensación (síntesis citoplásmica) y por elongación (síntesis mitocondrial) se ha postulado un mecanismo de síntesis en microsomas.

Este mecanismo consiste en una elongación que utiliza malonil-CoA (Christ y Hüllsmann, 1.962; Hüllsmann y Dow, 1.964; Stoffel y Ach, 1.964; Nugteren, 1.965; Guchhait et al., 1.966). Los equivalentes reductores son aportados por NADPH. La elongación microsomal difiere de la condensación en cuanto a: a) el enoil-CoA producido por deshidratación del β -hidroxiacil-CoA es un compuesto "cis" en el mecanismo de condensación y es "trans" en la síntesis microsomal; b) los compuestos intermediarios en el mecanismo de condensación permanecen ligados a proteínas y no son derivados de CoA, mientras que en la síntesis microsomal estos compuestos intermedios se liberan como derivados de CoA; c) en la síntesis microsomal se elongan ácidos grasos de más de 10 átomos de carbono, y d) la elongación microsomal puede tener lugar con los derivados acil-CoA insaturados de 18 carbonos.

Posteriormente se descubrió que en la síntesis "in vivo" de ácidos grasos en hígado, la mayor actividad corresponde a estas partículas microsomales (Favarger y col. 1.969; Rous y Aubry, 1.970).

1.2.4 SINTESIS DE ACIDOS GRASOS INSATURADOS.

Durante mucho tiempo se consideró que los ácidos grasos insaturados eran producto exclusivamente de la desaturación del correspondiente ácido graso saturado. Sin embargo, los trabajos de Bloomfield y Bloch (1.960) y Marsh y James (1.962) han aportado nuevas ideas sobre este problema. Actualmente se sabe que esta reacción de desaturación tiene lugar en microsomas (Bloomfield y Bloch, 1.960; Marsh y James, 1.962; Nagai y Bloch, 1.965) y requiere la presencia de NADPH y O_2 molecular (Holloway y Wakil, 1.964). Por otra parte, la reacción de desaturación puede ir acompañada de una reacción de elongación, con lo que el mismo ácido graso saturado puede servir como precursor de ácidos insaturados de diferente longitud de cadena.



Todos los ácidos polienuicos presentes en los mamíferos se forman, por reacciones de elongación y/o desaturación, a par

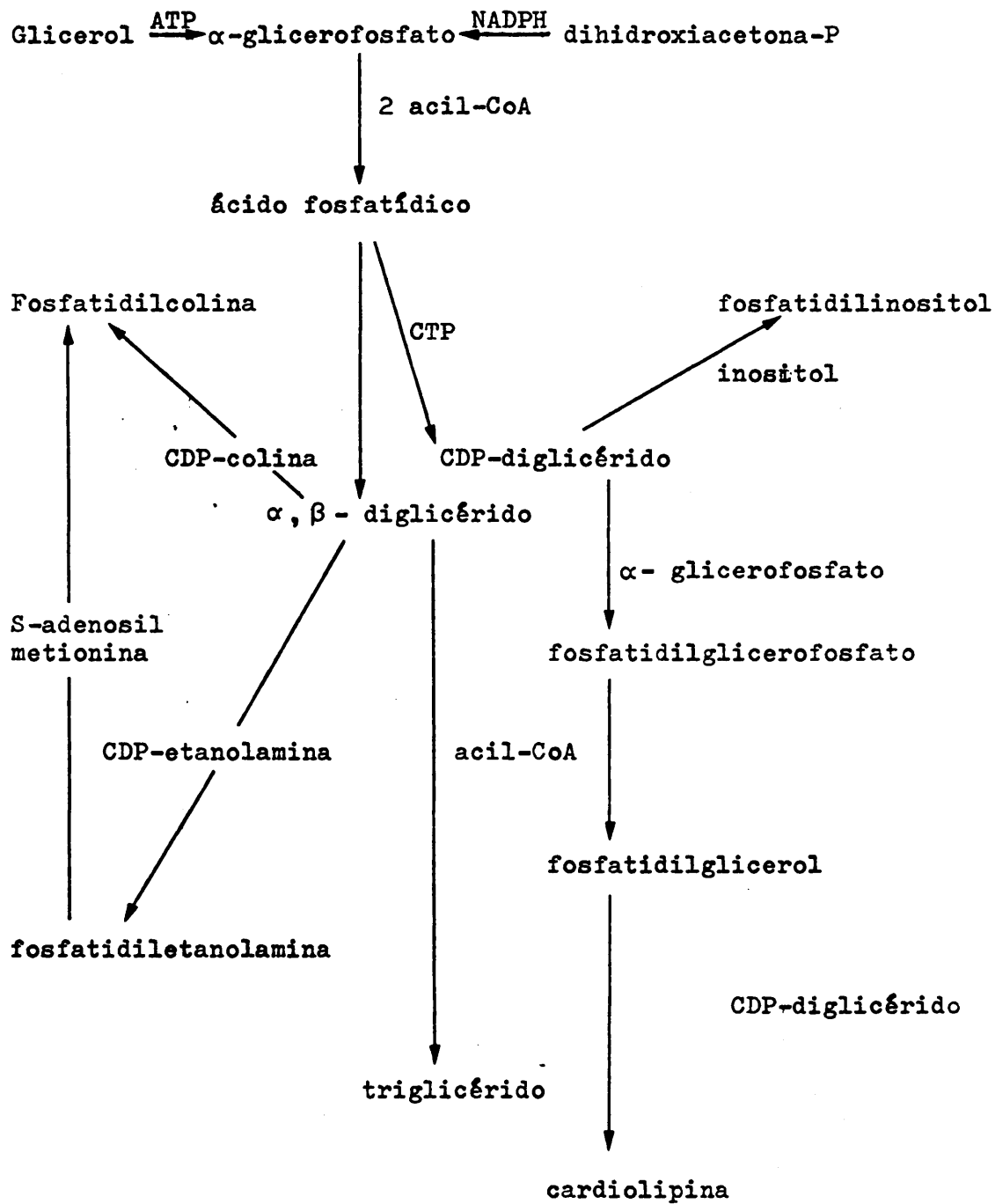
tir de cuatro precursores: palmitoleico, oleico, linoleico y linolénico. Sin embargo, los ácidos grasos linoleico y linolénico no pueden ser sintetizados por los mamíferos, quienes tienen que ingerirlos de fuentes vegetales, por lo que son ácidos grasos esenciales.

También ha sido propuesta en mamíferos la síntesis "de no vo" de ácido oleico. De hecho, la avidina inhibe la síntesis de ácido esteárico pero no la de oleico en extractos de mitocondria (Harlan y Wakil, 1.963), por lo que debe excluirse un origen común para estos dos ácidos. Los estudios "in vivo" confirman esta hipótesis (Dupois y Favarger, 1.963; Rajn y Reiser, 1.969).

1.3 BIOSÍNTESIS DE TRIGLICERIDOS Y FOSFOLÍPIDOS.

1.3.1 MECANISMO DE BIOSÍNTESIS "DE NOVO".

La biosíntesis "de novo" de triglicéridos y fosfolípidos (Kennedy, 1.961) tiene lugar mediante una ruta que es en parte común para ambas clases de glicerolípidos y en la cual el ácido fosfatídico ocupa una posición central (Fig. 1).



Esquema de biosíntesis de Triglicéridos y Fosfolípidos

Figura 1

El mecanismo principal de biosíntesis del glicerol lipídico es a través del α -glicerofosfato (sn-glicerol-3-fosfato) que procede de la fosforilación del glicerol mediante ATP o por reducción de la dihidroxiacetona-fosfato, reacciones ambas que tienen lugar en el citoplasma celular. En el tejido adiposo, la fosforilación de la glicerina constituye un mecanismo cuya importancia cuantitativa en la formación de α -glicerofosfato es prácticamente nula, lo cual fue atribuido por Margolis y Vaughan (1.966) a la ausencia en este tejido de la correspondiente gliceroquinasa, que es sin embargo muy activa en hígado. Posteriormente, sin embargo, Robinson y Newsholme (1.967) han puesto de manifiesto la existencia en tejido adiposo de rata de una actividad enzimática muy baja de gliceroquinasa.

Existe además otro mecanismo que implica la acilación de dihidroxiacetona-fosfato y posterior reducción con NADPH (Hajra y Agranoff, 1967; Manning y Brindley, 1.972).

Sin embargo, los estudios realizados "in vitro" por Rogstad et al., (1.974) en células aisladas de hígado de rata han puesto de manifiesto que el papel desempeñado por este mecanismo es de menos importancia desde el punto de vista cuantitativo, aunque queda todavía por demostrar la importancia relativa de esta ruta y la del α -glicerofosfato "in vivo".

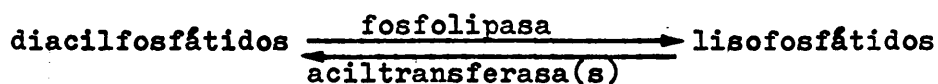
Los estudios llevados a cabo sobre la acilación del α -glicerofosfato ponen de manifiesto que en hígado de rata las enzimas acilantes están localizadas en la membrana mitocondrial externa en el retículo endoplásmico. En mitocondrias de distintos órganos de rata y de hígado de diferentes especies de mamíferos (rata, conejo, bovino, mono, humanos), los sustratos más efectivos en la acilación del α -glicerofosfato son ácidos grasos saturados, existiendo en hígado de rata dos actividades máximas, una para palmítico y otra para láurico (Daae, 1.972a, 1.972b, 1.973). El principal producto de la reacción mitocondrial es ácido lisofosfatídico. En microsomas, los ácidos grasos saturados e insaturados

son buenos sustratos para las reacciones de acilación, siendo el ácido fosfatídico el principal producto de esta reacción (Daae, 1.972a, 1.973).

Varios autores (Kano y Ohno, 1.973a; Sinclair, 1.971; Sundler et al., 1.974) han comprobado en microsomas de hígado de rata la reversibilidad de la reacción catalizada por CDP-colina:1,2-diacilglicerol colina (y etanolamina) fosfotransferasas, que da lugar a la formación de CDP-colina y CDP-etanolamina a partir de los fosfolípidos endógenos. Asimismo, Kano y Ohno (1.973b) han encontrado que los 1,2-diglicéridos formados por inversión de dicha reacción se degradan por la actividad microsomal; esta fracción celular posee actividad 1, 2-diglicérido fosfoquinasa que utiliza los 1, 2-diglicéridos, tanto endógenos como exógenos, para formar ácidos fosfatídicos.

1.3.2 MECANISMO DE DESACILACION-REACILACION.

La distribución típica de ácidos grasos en fosfolípidos de mamíferos es asimétrica, con predominio de los ácidos grasos saturados en la posición 1, mientras que los ácidos insaturados se localizan predominantemente en la posición 2. Lands (1.965) ha postulado que esta distribución asimétrica de ácidos grasos debe ser el resultado de la actuación de un ciclo fosfolipasa-aciltransferasa:



Este mecanismo fue descrito por primera vez en sobrenadante de hígado de rata por Erbland y Marinetti (1.962) y también fue puesto de manifiesto en sobrenadante de pulmón de rata (Van den Bosch et al., 1.965). Los experimentos llevados a cabo en homogeneizados de hígado y pulmón de rata (Van den Bosch et al., 1.965) y microsomas de hígado de rata (Erbland y Marinetti, 1.965) han demostrado que la incorporación de 1-acil-sn-glicero-3-fosfo

rilcolina a lecitina "in vitro" tiene lugar casi exclusivamente por acilación directa, mientras que el mecanismo de transacilación entre 2 monoacil-sn-glicero-3-fosforilcolinas sólo es detectable "in vitro" bajo condiciones de deficiencia energética en el citosol.

Vereyken et al., (1.972) han realizado un estudio comparativo de la biosíntesis de varias especies moleculares de lecitina en pulmón de rata y de lecitina y fosfatidiletanolamina en hígado de rata.

Los resultados obtenidos por estos autores en la biosíntesis "in vivo" de fosfatidilcolina en hígado de rata, están de acuerdo con los estudios previos realizados por Hill et al., (1.966) Van Golde et al., (1.969) y Kanoh, (1.969) "in vitro" y los estudios "in vivo" de Akesson et al. (1.970), en el sentido de que el mecanismo que opera predominantemente en la biosíntesis de especies moleculares que contienen ácido linoleico es la síntesis "de novo" via CDP-colina, y en particular en las especies palmitil-linoleil (Akesson, 1.970). Por el contrario, las especies moleculares de lecitina que contienen ácidos tetraenoicos, y concretamente ácido araquidónico, se sintetizan predominantemente por acilación de monoacil-sn-glicero-3-fosforilcolina.

En la biosíntesis de fosfatidiletanolamina en hígado de rata el mecanismo operante principal en las especies moleculares que contienen ácidos hexaenoicos es la síntesis "de novo" via CDP-etanolamina. Por otra parte, estas especies hexaenoicas muestran una elevada velocidad de recambio; esto es debido, probablemente, a que los 1, 2-diacil-sn-glicerol hexaenoicos son convertidos a etanolaminas mucho mas rápidamente que las restantes especies de diacilgliceroles, como han sugerido Kanoh (1.970) y Akesson et al. (1.970). Otra posible explicación adicional a este hecho es que las especies hexaenoicas, inicialmente sintetizadas por un mecanismo "de novo" pueden ser degradadas rapidamente, posiblemente por acción de fosfolipasa A_2 , que libera el ácido hexaenoí

co; la fracción restante de 1-acil-sn-glicero-3-fosforiletanolamina puede ser reaclada con otros ácidos distintos, con el consiguiente incremento de las actividades específicas relativas de las especies moleculares que contengan estos ácidos.

Los resultados obtenidos en la biosíntesis "in vivo" de lecitinas de pulmón sugieren que la síntesis "de novo" via CDP-colina, cuando se la compara al ciclo desacilación-reacilación, contribuye relativamente más a la formación de lecitinas insaturadas en pulmón que en hígado. Así, se puede concluir que en pulmón la síntesis "de novo" es el mecanismo predominante en la formación de lecitinas que contienen ácido linoleico y araquidónico y contribuye también significativamente a la síntesis de lecitinas monoenoicas y desaturadas, aunque en la biosíntesis de estas últimas especies parece existir una contribución importante del mecanismo de desacilación-reacilación.

Los estudios de Lands y Merkl (1.963) y Van den Bosch (1.968), así como los resultados obtenidos por Vereyken et al. (1.972), ponen de manifiesto que las aciltransferasas de hígado de rata catalizan preferentemente la unión de ácidos grasos insaturados a la posición 2 de 1-acil-sn-glicero-3-fosforilcolina, pero en contraste con esto, las aciltransferasas de pulmón no catalizan una incorporación preferente de ácidos grasos insaturados a la posición 2, sino que la incorporación de ácido palmítico a esta posición es casi igual a la de oleico y linoleico. Se ha encontrado, asimismo, que las aciltransferasas catalizan la unión de cantidades significativas de ácido palmítico a lecitinas de pulmón en perro (Frosolono et al., 1.971), por lo que el mecanismo de acilación de lisolecitina debe desempeñar un papel muy importante en la formación o el mantenimiento de las elevadas cantidades de dipalmitil lecitina existentes en el pulmón de estas especies, hecho muy importante desde el punto de vista fisiológico por ser la dipalmitil lecitina el compuesto considerado como principal responsable de la actividad superficial del pulmón que evita el colapso alveolar.

Así pues, se puede concluir que la síntesis de dipalmitoil lecitina en pulmón se realiza, al menos parcialmente por el mecanismo de síntesis "de novo" vía CDP-colina, representando el ciclo desacilación-reacilación un mecanismo adicional importante en la biosíntesis o el mantenimiento de este importante compuesto para la actividad pulmonar.

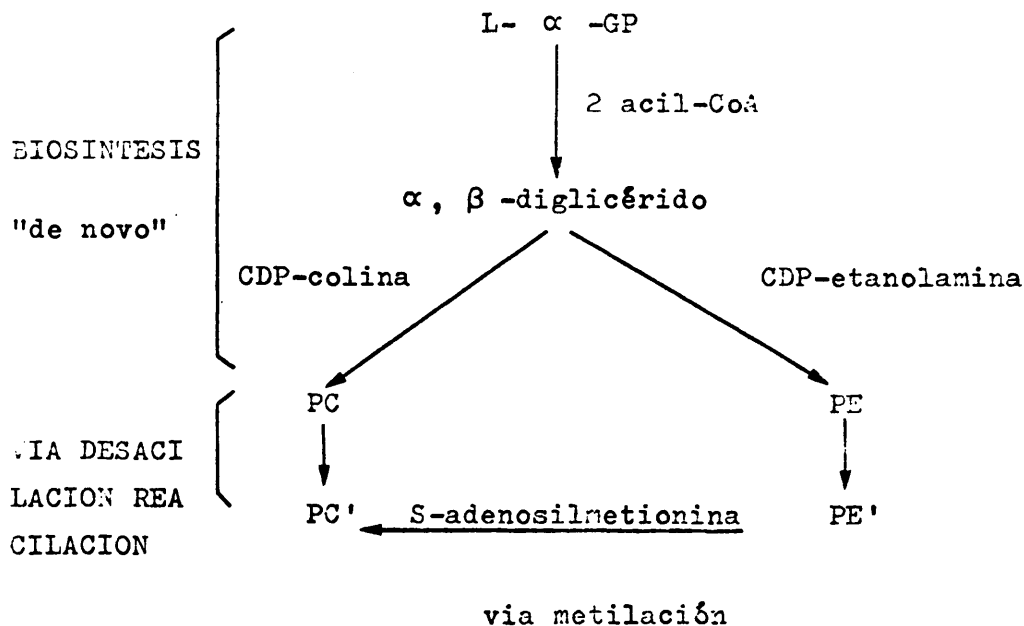
1.3.3 MECANISMO DE METILACION

Uno de los mecanismos de biosíntesis de lecitinas cuya existencia está bien establecida experimentalmente es el de la N-metilación de fosfatidiletanolamina por transferencia sucesiva de tres grupos metilo procedentes de S-adenosilmetionina (Gibson et al., 1.961). Sin embargo, recientemente, Salerno y Beeler (1.976) al estudiar la biosíntesis "in vivo" de fosfolípidos y sus precursores en hígado de rata, han encontrado que no sólo fosfatidiletanolamina, sino también etanolamina, fosforiletanolamina y CDP-etanolamina son sustratos para la reacción de metilación, por lo que proponen debe ser revisada la creencia general de que el único sustrato para la metilación es la molécula completa de fosfatidiletanolamina, idea basada en que en experiencias anteriores realizadas "in vitro" (Gibson et al., 1.961 ; Bremer y Greenberg, 1961) no se consiguió detectar la metilación de esos precursores. Estos autores han encontrado también que esta vía de metilación produce preferentemente fracciones más insaturadas de fosfatidilcolina, mientras que la incorporación de colina a fosfatidilcolina en hígado tiene lugar fundamentalmente por fosforilación vía CDP-colina y está favorecida sobre todo en las fracciones más saturadas de lecitina.

Con respecto a la biosíntesis de especies moleculares con actividad superficial en pulmón, hay que citar que los trabajos de Björnstad y Bremer (1.966), Wolfe et al. (1.970) y Di Augusti

ne (1.971), han puesto de manifiesto que la contribución del mecanismo de metilación de fosfatidiletanolamina a la formación de lecitinas de pulmón, y especialmente de dipalmitil lecitina, es muy poco importante.

En el siguiente esquema se relacionan los diferentes mecanismos de biosíntesis de fosfolípidos estudiados hasta este momento.



1.3.4 MECANISMOS DE INTERCAMBIO DE BASES NITROGENADAS

Durante los últimos años se ha ido acumulando una evidencia cada vez mas decisiva de que la colina puede ser incorporada "in vivo" en forma libre a lecitinas de hígado de ratas por un mecanismo que no implica la formación de CDP-colina como intermedio (Treble et al., 1.970; Bjerve, 1.971, 1.972). Se ha sugerido que este mecanismo que opera "in vivo" debe ser el mismo que es responsable de la incorporación de colina libre "in vitro"

estimulada por Ca^{2+} (Dils y Hübscher, 1.961), el cual ha sido reconocido también en fracciones subcelulares de los cerebros de pollo (Porcellati et al., 1.971) y rata (Kaufer, 1.972), obteniéndose en todos los tejidos estudiados que la máxima actividad de este mecanismo está asociada a la fracción microsomal. Este mecanismo que actúa "in vitro" parece ser común para colina, etanolamina y L-serina y actúa sin requerimiento de energía por lo que se ha supuesto que esta reacción consiste en un intercambio de bases nitrogenadas con fosfolípidos ya preformados. Bjerve (1.973a) ha estudiado la incorporación "in vitro" de bases libres a fosfolípidos de hígado de rata, encontrando que esta incorporación está localizada exclusivamente en la fracción microsomal y que la incorporación de etanolamina tiene lugar preferentemente en las especies poliinsaturadas de fosfatidiletanolamina. Además, este mecanismo de incorporación de bases libres debe ser el sistema principal para la biosíntesis "in vivo" de fosfatidilserina en hígado de rata, mientras que la síntesis "in vivo" de lecitina y fosfatidiletanolamina por este mecanismo es cuantitativamente despreciable, resultado que está de acuerdo con los de otros autores (Salermo y Beeler, 1.973; Sundler, 1.973) según los cuales la incorporación de colina y etanolamina "in vivo" en fosfolípidos de hígado de rata tiene lugar predominantemente por fosforilación via CDP-base, siendo despreciable cuantitativamente en intercambio de bases. En cuanto a los fosfolípidos que participan como sustratos en la reacción de intercambio de bases, Bjerve (1.973b) ha establecido que en microsomas de hígado de rata pueden actuar como sustratos lecitinas, fosfatidiletanolaminas y fosfatidilserinas, existiendo como única restricción la imposibilidad de que fosfatidiletanolamina se transforme en fosfatidilcolina.

1.4 INFLUENCIA DE DIETA Y HORMONAS SOBRE LA COMPOSICION Y DISTRIBUCION DE ACIDOS GRASOS EN LIPIDOS.

La composición de ácidos grasos de las diferentes clases de lípidos de plasma y de tejidos se afecta por el tipo de dieta

y por influencias hormonales, así como por la administración de diversas sustancias exógenas.

La dieta, y especialmente una dieta rica en grasas, ejerce una influencia notable sobre la composición de ácidos grasos de los lípidos de la sangre y los tejidos, aunque el efecto cuantitativo es diferente según las especies (O-Hea y Leveille, 1.969; Abraham, 1.970; Holman, 1.963; Dryden et al., 1.973). Por otra parte, la alimentación durante un período prolongado con una dieta de bajo contenido de proteínas puede alterar la composición de ácidos grasos fosfolípidos de hígado de rata (Rogers, 1.972); estos cambios incluyen un descenso en las proporciones de los ácidos esteárico, araquidónico y docosahexaenoico y un incremento en los ácidos oleico y linoleico. Asimismo, la eliminación parcial de proteínas en la dieta puede producir alteraciones en la morfología y composición de los ácidos grasos de mitocondrias de hígado de rata (Harada, 1.967; Rogers, 1.971); las diferencias observadas incluyen un descenso en las proporciones de esteárico y araquidónico y un incremento de los ácidos palmítico, oleico y docosapentaenoico.

Noble, Christie y Moore (1.971) han estudiado los cambios en la composición de ácidos grasos de los lípidos del tejido adiposo perirrenal en corderos alimentados con leche materna o con una leche sintética con un bajo contenido en grasa durante los primeros ocho días desde su nacimiento; en el recién nacido, el 18:1 era el ácido graso más abundante en triglicéridos y fosfolípidos, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados estaban presentes exclusivamente en los fosfolípidos; en los animales alimentados con leche materna, durante los ocho días siguientes se observó un aumento considerable del 18:2 y un descenso del 20:3; en los animales alimentados con leche sintética no se produjeron cambios en las concentraciones de estos dos ácidos. Estos autores estudiaron también la distribución posicional de ácidos grasos en los lípidos del tejido adiposo perirrenal, observando que esta varía según el tipo de dieta recibido por los animales.

La administración a humanos de hormona del crecimiento durante un período de tres días provoca un incremento en los porcentajes de palmítico en triglicéridos y de linoleico y eicosatrienoico en fosfolípidos de suero, así como un descenso en el porcentaje de oleico en fosfolípidos (Jurand y Oliver, 1.970).

La administración de ciertas sustancias exógenas es capaz de provocar un cambio en los niveles normales de ácidos grasos y en su distribución en clases de lípidos. Así, el tratamiento con clofibrate de pacientes con hiperlipoproteinemia cambia la composición de ácidos grasos en fosfolípidos (incrementa el porcentaje de ácido nervónico), en triglicéridos (incrementa el porcentaje de eicosa pentaenoico) y en esteres de colesterol (elevación del porcentaje de ácido linolénico) (Takayasu et al., 1.971).

1.5 METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS PLASMÁTICOS.

1.5.1 SÍNTESIS HEPÁTICA DE LAS LIPOPROTEÍNAS.

Se considera actualmente que la síntesis de las lipoproteínas comienza cuando su parte proteica ya está formada (Mookerjee, 1.969; Lo y Marsh, 1.970; Bar-On et al., 1.973; Chapman et al., 1.973). Los péptidos de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de elevada densidad (HDL) son sintetizados en los ribosomas de los hepatocitos; los péptidos individuales se liberan de los ribosomas y se unen a un resto hidrocarbonado y a un fosfolípido, atravesando a continuación la membrana endoplásmica. La formación de la unión lípido-proteína tiene lugar en el interior de los sacos endoplásmicos. Después de su migración por el retículo endoplásmico y almacenamiento en el aparato de Golgi, las lipoproteínas son segregadas al medio extracelular por pinocitosis.

El mecanismo de secreción de las lipoproteínas es todavía desconocido. Los trabajos de perfusión del hígado con aminoácidos

marcados así como el estudio del destino metabólico de lípidos y apoproteínas individuales (Windmueller y Spaeth, 1.967; Ruderman et al., 1.968; Chapman et al., 1.973; Eisenberg y Rachmilewitz, 1.973) sugieren que sólo las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) son segregadas directamente por el hígado; las otras lipoproteínas se formarían a partir del catabolismo de las VLDL. Las lipoproteínas segregadas por el hígado no tienen todos los esteroides de colesterol que se encuentran en las lipoproteínas del plasma, sino que el colesterol se segrega principalmente como colesterol libre (Barter, 1.974) y su esterificación tiene lugar en el plasma por la acción de la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT).

Parece ser que la disponibilidad en el hígado de ácidos grasos, junto con la presencia de los carbohidratos de reserva apropiados, son factores fundamentales en la regulación de la biosíntesis de las lipoproteínas, aunque se desconoce el mecanismo responsable de este control (Ruderman et al., 1.968; Narayan, 1.970; Baraona y Lieber, 1.970).

1.5.2 SINTESIS DE LIPOPROTEINAS EN LA MUCOSA INTESTINAL.

Los quilomicrones transportan los triglicéridos de la dieta desde los sitios de absorción de lípidos en el intestino delgado, a través del conducto torácico, hasta la sangre y con ella a los sitios de utilización en los tejidos. Los quilomicrones se forman en la mucosa intestinal como respuesta a la ingestión de ácidos grasos de la dieta de una longitud de cadena a partir de 12 átomos de carbono (Fredrickson et al., 1.967). Estos ácidos son esterificados en la mucosa intestinal a triglicéridos y estos se asocian con los componentes estabilizadores de superficie -colesterol, fosfolípidos, proteínas- formando los quilomicrones (Zilversmit, 1.963). La presencia de la pequeña proporción de proteína que poseen los quilomicrones parece ser esencial para su formación y función. Se ha demostrado la síntesis "de novo" de la proteína de LDL en el intestino (Kessler et al., 1.970) y parece probable que el defecto metabólico causante de la abetalipoprotei

30

nemia sea la ausencia de síntesis del componente peptídico de las LDL en el intestino, con lo cual no se sintetizan quilomicrones y los triglicéridos se acumulan en la mucosa intestinal.

Las VLDL transportan los triglicéridos endógenos, y aunque el hígado parece ser el órgano mas importante en la síntesis de estas lipoproteínas, se ha demostrado que el intestino también sintetiza VLDL (Windmueller y Levy, 1.968; Ockner y Jones, 1.970; Windmueller et al ., 1.973), si bien estas representan solamente un 10% del total de las VLDL del plasma.

El mecanismo de transferencia de los quilomicrones y las VLDL del compartimento intracelular al extracelular es todavía des conocido.

1.5.3 CATABOLISMO DE QUILOMICRONES Y LIPOPROTEINAS DE MUY BAJA DENSIDAD

Los quilomicrones y VLDL transportan los triglicéridos en el plasma, tanto los procedentes de la dieta como los sintetizados en el hígado. Los mecanismos y centros de utilización de los triglicéridos plasmáticos han sido objeto de numerosos estudios (Nikkila, 1.969; Scow, 1.970; Fredrickson y Levy, 1.972); se sabe ac tualmente que los triglicéridos transportados por estas lipoproteínas se transforman en triglicéridos y fosfolípidos en las células de todo el organismo, a excepción del cerebro; la mayor parte de los triglicéridos se dirigen al tejido adiposo y a la musculatura esquelética, y en menor proporción al hígado, bazo, corazón y otros tejidos.

El tejido adiposo capta una parte importante de los triglicéridos circulantes por acción de la lipoproteína lipasa que está presente en la red capilar de este tejido. El diámetro de los quilomicrones y de VLDL es tan grande que no permite su paso a través del endotelio de los capilares del tejido adiposo y los triglicéridos tienen que ser hidrolizados antes de ser captados por

el tejido adiposo. Los estudios citoquímicos y de microscopía electrónica han demostrado que la hidrólisis se produce en el interior de las células endoteliales de los capilares (Scow et al., 1.972).

En los demás tejidos extrahepáticos, a excepción del cerebro, la captura de los triglicéridos de VLDL y quilomicrones tiene lugar después de la hidrólisis por una lipoproteína lipasa presente en estos tejidos.

La vida media de los quilomicrones en humanos es de 2 a 15 minutos. Después de la hidrólisis previa de los triglicéridos por la lipoproteína lipasa, los residuos ricos en colesterol y en fosfolípidos son captados por el hígado (Redgrave, 1.970). Los triglicéridos de las VLDL son captados menos rápidamente y la vida media de estas lipoproteínas es de 6 a 12 horas. Su hidrólisis por la lipoproteína lipasa da lugar a LDL y parece ser que todas las LDL del plasma derivan del catabolismo de las VLDL (Langer et al., 1.970). Las concentraciones de VLDL en plasma están determinadas al parecer por un balance entre síntesis y catabolismo; Los ácidos grasos libres. Los hidratos de carbono y otros precursores de la síntesis hepática de triglicéridos estimulan la producción de VLDL, mientras que insulina, lipoproteína lipasa y concentración absoluta de triglicéridos en sangre parecen ser los factores implicados en su catabolismo.

Los quilomicrones pueden ser también captados por el hígado, aunque actualmente se considera que esta captación directa por los hepatocitos es mucho menos importante de lo que se creía hace algún tiempo. Por el contrario, parece ser que el hígado capta la mayor parte de los ácidos grasos de los quilomicrones después que los triglicéridos de estos han sido hidrolizados. En apoyo de esta idea está el reciente descubrimiento de una triglicérido lipasa hepática (La Rosa et al., 1.972) que se ha demostrado que cataliza la hidrólisis de lipoproteínas ricas en triglicéridos (Krauss et al., 1.973; Assmann et al., 1.973).

En las VLDL, el núcleo de triglicéridos está rodeado de una capa de esteres de colesterol, fosfolípidos y proteínas. La captura de estos fosfolípidos en los tejidos tiene lugar por acción de dos enzimas: las fosfolipasas tisulares, PLA_1 y PLA_2 , que se liberan al plasma a la vez que la lipoproteína lípasa después de una inyección de heparina, y, en menor grado, la lecitina-colesterol aciltransferasa, que actúa sobre todo sobre las HDL y que hidroliza el grupo acilo en posición β de la lecitina y lo transfiere al OH en 3 de colesterol.

1.5.4 CATABOLISMO DE LIPOPROTEINAS DE ELEVADA Y BAJA DENSIDAD.

Estas dos familias de lipoproteínas tienen como función fundamental el transporte de colesterol. En humanos, las LDL transportan colesterol libre desde el hígado a los demás tejidos; las HDL transportarían el colesterol libre desde los tejidos hasta el hígado. En el plasma interviene la lecitina-colesterol aciltransferasa para esterificar el colesterol; esta enzima funciona casi exclusivamente con el colesterol de las HDL, y los esteres de colesterol resultantes de su acción se intercambian e incorporan rápidamente en las otras lipoproteínas (Rothblat, 1.972).

En conejas normales (Chung et al., 1.969), la distribución de colesterol entre las diferentes familias de lipoproteínas plasmáticas es similar a la de humanos normales, aunque sus niveles son menores que en humanos. Por otra parte, durante la absorción intestinal, la mayor parte del colesterol exógeno es transportado por las VLDL en forma de esteres de colesterol (Rudel, et al., 1.973).

1.6 REGULACION DEL METABOLISMO LIPIDICO.

1.6.1 ASPECTOS GENERALES DEL FLUJO DE TRIGLICERIDOS Y SU REGULACION.

Actualmente parece evidente que los triglicéridos (TG) presentes en el plasma proceden casi exclusivamente de dos únicas fuentes: el intestino y el hígado. En el período posterior a la absorción intestinal, es decir, en ausencia de ingestión de lípidos exógenos, casi todos los triglicéridos circulantes son de origen hepático.

El comportamiento cinético de los triglicéridos del plasma y del hígado, así como el de sus componentes, ácidos grasos y co-
lesterol, es muy complejo, presentando además importantes diferen-
cias según las especies animales, al menos en lo que se refiere a
humanos (Farquhar et al., 1.965), conejo (Havel, et al., 1.962),
rata (Parker y Schatz, 1.962) y perro (Gross, et al., 1.962).

En la figura 2 se presenta un esquema cinético simplifica-
do y la formación y utilización de triglicéridos plasmáticos y he-
páticos en un estado de alimentación normal.

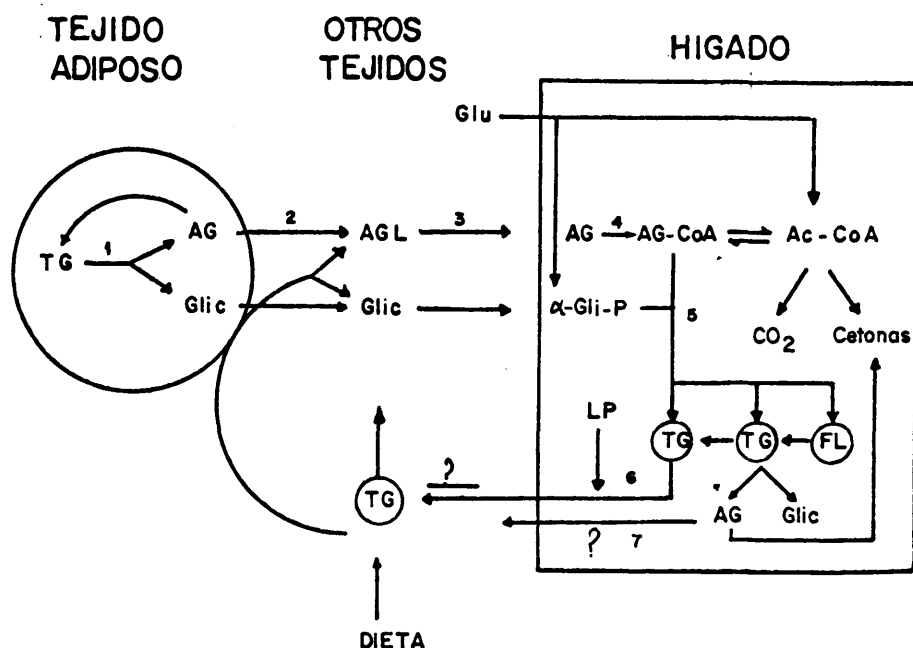


Figura 2

Los ácidos grasos constituyentes de los triglicéridos endógenos presentes en el plasma pueden proceder: (1) de los triglicéridos del tejido adiposo a través de los ácidos grasos libres (AGL) del plasma, (2) de los lípidos de la dieta, (3) de otros lípidos hepáticos, (4) de la síntesis hepática (lipogénesis) y (5) del reciclaje de triglicéridos plasmáticos degradados. La contribución cuantitativa de cada una de estas fuentes al "pool" de triglicéridos plasmáticos y hepáticos depende, entre otras variables, de la especie y del estado de alimentación. Así, en humanos, después de ayunar toda la noche, el principal precursor inmediato de los ácidos grasos constituyentes de los triglicéridos del plasma son los ácidos grasos libres (Eaton et al., 1.965); en conejo parece que también un mecanismo análogo a este predomina sobre los demás (Havel et al., 1.962), mientras que en rata sólo una parte mínima procede directamente de los ácidos grasos libres, siendo la fuente más importante, desde el punto de vista cuantitativo,

la lipogénesis hepática y los fosfolípidos (Baker y Schotz, 1.967); hay que destacar que en ratas alimentadas normalmente, la contribución mayor a los ácidos grasos constituyentes de los triglicéridos hepáticos procede de la dieta (Mendenhall, 1.973).

El paso de los ácidos grasos desde los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo hasta glicéridos plasmáticos consta de las siguientes etapas principales:

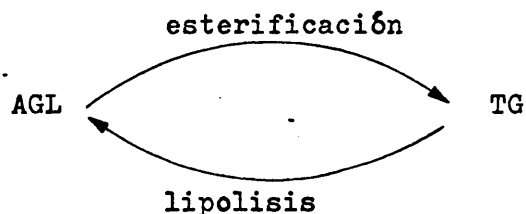
- 1.- Lipólisis de los triglicéridos del tejido adiposo.
- 2.- Liberación de AGL que pasan a la circulación.
- 3.- Captura por el hígado de los AGL del plasma, que pasan a las membranas mitocondrial y microsomal.
- 4.- Formación de derivados acil-CoA.
- 5.- Esterificación a triglicéridos (glicerofosfato acil transferasa).
- 6.- Unión de los triglicéridos a la apolipoproteína.
- 7.- Secreción al plasma de las lipoproteínas de muy baja densidad y lipoproteínas de baja densidad.

Con toda probabilidad, los puntos más importantes de control de la secreción de triglicéridos hepáticos están localizados en los pasos 2, 5 y 6 del esquema anterior. Por otra parte, la actividad lipogénica del hígado parece ser un factor importante en la liberación de triglicéridos hepáticos (Windmueller y Spaeth, 1.967); además, al perfundir hígado de rata, la secreción de triglicéridos es proporcional a la concentración de ácidos grasos libres en el medio de perfusión (Heimberg et al., 1.969). Estos hechos sugieren que entre las reacciones 2 y 7 no hay etapas limitantes de la velocidad y que los niveles de AGL en plasma debe ser un factor determinante en la liberación de triglicéridos al plasma al menos en aquellas especies (hombre, conejo) en las que los ácidos grasos libres del plasma son los precursores principales de los ácidos grasos constituyentes de los triglicéridos plasmáticos.

Pero aunque esto sea un factor importante en la regulación de la concentración de triglicéridos plasmáticos, otras reacciones entre las señaladas en el esquema anterior pueden ser también factores determinantes en la secreción de triglicéridos hepáticos. Esto se pone de manifiesto en el estado de ayuno, en el cual los niveles de ácidos grasos libres son elevados pero la secreción de triglicéridos es baja. Aparentemente, la reacción de esterificación (etapa 5) y la síntesis de apolipoproteína (etapa 6) serían pasos clave en esta regulación. De hecho, la esterificación puede estar influenciada no sólo por la actividad de las enzimas, sino también por la velocidad de producción y disponibilidad de glicerofosfato (Tzur et al., 1.964). Por otra parte, los resultados de Reaven (1.965) en humanos sugieren que la capacidad para la secreción de triglicéridos hepáticos tiene un máximo, y este límite puede representar la velocidad máxima de síntesis de la apolipoproteína. Esta idea está apoyada por el estudio de Eaton (1.973) que sugiere que la inhibición provocada por glucagón de la síntesis del componente proteínico de las lipoproteínas de muy baja densidad puede contribuir significativamente a la acción hipolipémica de esta hormona.

1.6.2 REGULACION DE LA LIPOLISIS.

Las reacciones clave en el metabolismo lipídico del tejido adiposo son la biosíntesis de triglicéridos y su hidrólisis (lipolisis).



El proceso limitante de la velocidad de hidrólisis de los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo es la hidrólisis

del primer enlace ester, etapa catalizada por una lipasa comúnmente denominada "lipasa sensible a hormonas" (Vaughan et al., 1.964; Steinberg, 1.967; Schwartz y Jungas, 1.971; Chemelarova y Chmelar, 1.974). Además, el tejido adiposo posee enzimas que hidrolizan diglicéridos y monoglicéridos y cuya actividad es muy elevada; sin embargo, estas lipasas no parecen estar sometidas a control hormonal.

Se considera actualmente que la regulación actual de la lipólisis en el tejido adiposo implica la actuación del AMP-cíclico como "segundo mensajero" de la acción hormonal (Huttunen y Steinberg, 1.971; Robison, Butcher y Sutherland, 1.971). Los niveles de AMP-cíclico están controlados por las actividades de adenil ciclasa y de su fosfodiesterasa específica; esta última se inhibe por metilxantinas, de modo que las acciones fisiológicas de estas a nivel del tejido adiposo son semejantes a las de las hormonas lipolíticas.

La acción de las hormonas lipolíticas sobre el metabolismo lipídico del tejido adiposo tiene lugar a través de una elevación intracelular de los niveles de AMP-cíclico en el adipocito como resultado de la activación de la adenil ciclasa. Las membranas plasmáticas aisladas de adipocitos poseen un sistema adenil ciclasa que se activa por seis hormonas: ACTH, glucagón, secretina, LH, TSH y catecolaminas (Bär y Hechter, 1.969; Rodbell, Birnbaumer y Pohl, 1.970).

La lipólisis requiere energía y se inhibe cuando se bloquea la fosforilación oxidativa (Fassina, 1.967). Por otra parte, se ha encontrado que la triglicérido lipasa del tejido adiposo se activa en presencia de AMP-cíclico y ATP cuando se añade una proteína quinasa dependiente de AMP-c (Corbin et al., 1.970; Huttunen et al., 1.970). Estos hechos, junto con la identificación de una proteína quinasa dependiente de AMP-cíclico en el tejido adiposo (Corbin et al., 1.972) indican que el AMP-cíclico activa la lipasa a través de una proteína quinasa dependiente de AMP-cíclico:

la unión de la AMP-c a la subunidad reguladora (R) de la proteína quinasa (RC) permite la disociación de la enzima, dejando libre la subunidad catalítica (C) (Brostrom et al., 1.971):



En cuanto a la insulina, sus acciones sobre la lipólisis no permiten una interpretación inequívoca en cuanto a su modo de actuación. Se sabe que esta hormona ejerce en el tejido adiposo efectos que son contrarios a los producidos por glucagón y epinefrina. El descubrimiento por Butcher y col. (1.968) de que en ciertas condiciones la insulina disminuye los niveles de AMP-cíclico en tejido adiposo y de un efecto análogo sobre los niveles de AMP-cíclico en hígado en oposición a glucagón y epinefrina (Exton et al., 1.971) hizo pensar que este efecto sobre los niveles de AMP-cíclico podía estar basada la acción de insulina, pero no se ha conseguido identificar un mecanismo enzimático para este efecto sobre los niveles de AMP-cíclico. De hecho, existe una cierta evidencia de que la insulina debe bloquear la activación de la adenil ciclase provocada por hormonas lipolíticas en células adiposas y hepáticas (Hepp, 1.971; Illiano y Cuatrecasas, 1.972). Otra interpretación que se ha considerado para explicar estos hechos es la acción de insulina sobre la actividad fosfodiesterasa. El análisis de los diferentes resultados obtenidos a este respecto sugieren que al menos algunas de las acciones metabólicas de insulina pueden ser debidas a la activación de una AMP-c fosfodiesterasa presente en las membranas plasmáticas (Appleman et al., 1.973).

Aunque la inhibición de la lipólisis por insulina es un hecho bien establecido, no se trata sin embargo de un efecto invariable. Así, esta inhibición no se observa en presencia de glucosa (Hall y Ball, 1.970), e incluso la actividad lipolítica de catecolaminas se incrementa notablemente por adición de glucosa e insulina (Angel et al., 1.971; Desai et al., 1.973). Por otra parte, el efecto inhibitor que sobre la lipólisis estimulada hormonalmente ejerce la insulina se convierte en una activación al in-

crementar la concentración de la hormona lipolítica o la de insulina (Desai et al., 1.973; Kono y Barham, 1.973); este efecto antilipolítico y lipolítico de insulina se correlaciona positivamente con cambios en la concentración intracelular de AMP cíclico (Desai et al., 1.973).

La glucosa, con o sin insulina actúa siempre estimulando la lipólisis "in vitro" (Desai et al., 1.973; Knigh y Ilife, 1.973) pero no afecta a los niveles de AMP-c en el tejido adiposo (Knigh y Ilife, 1.973). Por otra parte, la lipólisis estimulada hormonalmente se inhibe a medida que en el plasma la albúmina se satura con los ácidos grasos liberados por el tejido adiposo, y este efecto va acompañado de un aumento en la cantidad de ácidos grasos (Metz et al., 1.973; Cushman et al., 1.973), por lo que parece que tanto "in vitro" como "in vivo" el grado de saturación de la albúmina en el plasma con ácidos grasos libres es uno de los factores que regulan la movilización de ácidos grasos del tejido adiposo.

1.6.3 ACCIONES DE INSULINA SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO.

1.6.3.1 EFECTO SOBRE LOS NIVELES DE LIPIDOS PLASMATICOS

Uno de los efectos más claros e inmediatos de la administración "in vivo" de la insulina es el descenso en los niveles en suero de ácidos grasos libres y glicerol, metabolitos cuyo aporte más importante cuantitativamente procede del tejido adiposo; este efecto, ampliamente documentado, se atribuye fundamentalmente a la acción antilipolítica de la insulina en el tejido adiposo y se ha estudiado ampliamente en la sección anterior.

Existe un número relativamente escaso de datos acerca del efecto de la insulina sobre los niveles de triglicéridos en suero humano no diabético. Jones y Arky (1.965) han descrito que en humanos normales una única inyección de insulina no altera los niveles de triglicéridos en suero, pero una infusión prolongada de la

hormona origina un notable descenso de estos niveles. En mujeres, tanto gestantes como no gestantes, se produce un marcado descenso de los triglicéridos en suero tres horas después de una única inyección intravenosa de insulina (Dannenburg y Burt, 1.965). Asimismo, la inyección de insulina a ratas ayunadas provoca un descenso en la liberación de triglicéridos hepáticos al plasma, efecto que puede ser interpretado como debido a un descenso en el flujo de ácidos grasos procedentes del tejido adiposo hacia la síntesis hepática de triglicéridos para su secreción al plasma (Alcindor et al. 1.973).

1.6.3.2 EFECTO SOBRE LA SINTESIS HEPATICA DE ACIDOS GRASOS.

La lipogénesis hepática está inhibida en ratas sometidas a ayuno y en ratas a las que se ha provocado diabetes aloxánica, y esta inhibición es debida a una disminución en los niveles de acetil-CoA carboxilasa y de ácido graso sintetasa; estas actividades recuperan sus valores normales por administración de insulina (Gonçalves et al., 1.972).

Haft (1967) ha encontrado que cuando se perfunde hígado de rata en concentraciones fisiológicas de glucosa, la adición de insulina al medio de perfusión incrementa la incorporación de acetato- ^3H y glucosa- ^{14}C a ácidos grasos totales de hígado. Un resultado análogo ha sido obtenido por Williamson et al. (1.966) en la perfusión de hígado de rata sometida a ayuno.

Un mecanismo probablemente importante en el control de la biosíntesis hepática de ácidos grasos "in vivo" es el ejercido por los ácidos grasos libres y glicerol del plasma y sus metabolitos hepáticos. Por otra parte, las investigaciones llevadas a cabo acerca de la influencia de la insulina sobre la lipogénesis hepática (Sweeney y Ashmore, 1965; Bewsher et al. 1966) sugieren que la insulina puede incrementar de forma rápida la síntesis

de ácidos grasos en el hígado mediante una acción que es primaria mente hepática aunque pueda estar potenciada "in vivo" por otros efectos extrahepáticos de la hormona, por ejemplo, su antilipolisis. Esta acción, cuya localización debe ser ajena a las rutas metabólicas de la glucosa, parece tener lugar a nivel de la propia síntesis de ácidos grasos. En este sentido, son muy significativos los trabajos de Bricker y Levey (1.972) y de Allred y Roehring (1.973) que ponen de manifiesto que en hígado de rata la lipogénesis hepática a partir de acetato se inhibe por AMP-cíclico y su dibutiril derivado, y que esta inhibición tiene lugar a nivel de la acetil-CoA carboxilasa. Esto sugiere que la activación de la lipogénesis hepática por insulina puede ser mediada por el AMP-cíclico.

El efecto a largo plazo del hiperinsulinismo "in vivo sobre la lipogénesis hepática en animales normales no diabéticos ha recibido relativamente poca atención pese a su indudable importancia. Quizá donde los efectos de un hiperinsulinismo crónico son mejor observados en relación con la lipogénesis es en los animales con obesidad experimental o hereditaria, siendo el más representativo de ellos el ratón con síndrome obeso-hiperglucémico hereditario; en estos animales el metabolismo lipídico es claramente anormal y estas alteraciones pueden considerarse como secundarias a la excesiva e incontrolada secreción de insulina. En estos animales la síntesis hepática de ácidos grasos a partir de acetato (Winand et al., 1.968), citrato (Howard y Lowenstein, 1.965) y glucosa (Jansen et al., 1.967) está incrementada varias veces con relación a los animales normales y permanece elevada incluso durante el ayuno. Esta estimulación de la lipogénesis hepática es debida a las elevadas actividades de citrato liasa (Kornacker y Lowenstein, 1.964) y acetil-CoA carboxilasa y ácido graso sintetasa (Chang et al., 1.967). También, como es de esperar debido a los elevados niveles de insulina en plasma, la actividad de la glucoquinasa hepática y otras enzimas clave de la glicolisis es también muy superior a la normal (Seidman et al., 1.967).

1.6.3.3 EFECTO SOBRE LA SINTESIS DE TRIGLICERIDOS DE HIGADO Y PLASMA.

Se ha citado anteriormente que el efecto antilipolítico de la insulina debe ser el principal responsable del descenso de los niveles de ácidos grasos libres y glicerol en suero que se produce después de la administración de insulina "in vivo". Aunque algunos autores proponen que esta es la única causa responsable de dicho efecto (West y Passey, 1.976), otros investigadores consideran que existe además un efecto adicional debido a que la insulina estimula la captura por el hígado de los ácidos grasos libres del plasma (Penhos et al., 1.968).

Como consecuencia de estas acciones extrahepáticas de insulina disminuye la aportación de precursores procedentes del plasma para la síntesis hepática de triglicéridos. Si este efecto no es compensado por un incremento en la lipogénesis hepática y en la formación de α -glicerofosfato endógeno, se producirá un descenso en la producción de triglicéridos en el hígado y en su secreción en el plasma en forma de lipoproteínas, aunque la insulina no actúe directamente sobre esta última etapa. Los estudios llevados a cabo en rata (Rubenstein y Rubenstein, 1.966) y en humanos (Csorba et al., 1.966; Nestel, 1.967) sugieren que ninguno de los pasos metabólicos que tienen lugar en la transformación de ácidos grasos libres del plasma en triglicéridos plasmáticos es controlado directamente por insulina, por lo que el descenso de los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres provocado por la acción antilipolítica de la insulina provoca un descenso paralelo en la secreción de triglicéridos hepáticos al plasma.

1.6.3.4 EFECTO SOBRE LA UTILIZACION DE TRIGLICERIDOS PLASMATICOS.

Aunque el rápido descenso en los niveles de triglicéridos

plasmáticos provocado por insulina puede explicarse por un descenso en la secreción de triglicéridos hepáticos, hay varias indicaciones de que esta hormona influye también sobre los mecanismos de utilización de los triglicéridos tanto de origen alimenticio como endógeno.

El transporte de triglicéridos desde la sangre al tejido adiposo está íntimamente relacionado con la actividad lipoproteílica lipasa de los adipocitos. Cuando en tejido adiposo se incubaba en presencia simultánea de glucosa e insulina se produce una activación de la lipoproteína lipasa, probablemente por estimulación de la síntesis "de novo" de la enzima (Salaman y Robinson, 1.966). También se ha comprobado que la administración de insulina "in vivo" provoca un incremento muy rápido de la actividad de lipoproteína lipasa en tejido adiposo de ratas alimentadas y ayunadas (Nikkilä y Pikälistö, 1.968).

En ratas sometidas a ayuno se observa también un incremento en la actividad de lipoproteína lipasa que parece ser debido asimismo a una estimulación de la síntesis de la enzima (Wing y Robinson, 1.968; Patten, 1.970).

Por otra parte, la actividad de lipoproteína lipasa es inhibida "in vitro" por una serie de hormonas (Nestel y Austin, 1.969); de estas hormonas-catecolaminas, ACTH, TSH y glucagón-se sabe además que estimulan la lipólisis en el tejido adiposo a través de una elevación de los niveles de AMP-cíclico; esto ha sugerido que también la lipoproteína lipasa puede estar regulada en su actividad por AMP-cíclico, de forma inversa a la lipasa sensible a hormonas, esto es, la disminución de la concentración de AMP-cíclico en el adipocito provocaría la conversión de una forma de lipoproteína lipasa en otra forma más activa (Cunningham y Robinson, 1.969), hipótesis que parece ser apoyada por los estudios posteriores de Stewart y Schotz (1.971) y Garfinkel y Schotz, (1.972, 1.973).

El estudio llevado a cabo por Cryer et al., (1.973) parece armonizar ambas ideas sobre la regulación de la lipoproteína lipasa, según estos autores, el aumento progresivo de la actividad lipoproteína lipasa que tiene lugar en la incubación de tejido adiposo de ratas ayunadas se produce en dos etapas, la primera de las cuales no es dependiente de síntesis de proteínas y la segunda si.

1.7 INFLUENCIA DE LA GESTACION SOBRE EL METABOLISMO DE LIPIDOS.

Se sabe que la gestación produce notables cambios en el metabolismo intermediario; hay cantidad de literatura que se refiere a la llamada "influencia diabetogénica" de la gestación y "pre diabetes de embarazo" (Lind et al., 1.973), y sobre otros problemas complejos tanto fisiológicos como clínicos.

Con pocas excepciones, las investigaciones de esta naturaleza se han venido realizando, fundamentalmente, sobre el metabolismo de hidratos de carbono; sin embargo, según los estudios que se están realizando en los últimos años, es presumible que muchas de las citadas alteraciones tengan lugar en el metabolismo lipídico.

1.7.1 MODIFICACIONES CUANTITATIVAS DE LOS LIPIDOS PLASMATICOS.

Se han realizado estudios de este tipo con gran profusión en humanos, desde el primer trimestre de gestación hasta varios días después del parto; analizando los resultados estadísticamente, se han puesto de manifiesto los siguientes hechos: (Mullick et al., 1.964; Cavalli, 1.965; Fairweather, 1.971; Fabran et al., 1.968; Dannenburg et al., 1.965; Vikrot, 1.964):

- Una hiperlipemia, que comenzando en el primer trimestre,

se incrementa progresivamente y se mantiene hasta 6 días después del parto.

- Un incremento en el nivel de ácidos grasos totales, que comienza en el segundo trimestre y llega a su elevación máxima en los tres últimos meses de gestación, para descender después de 4 días de estado puerperal.
- Una hipercolesterolemia (con igual incremento de colesterol libre y esterificado) que manifestándose ya en el primer trimestre, alcanza el máximo al final de la gestación, manteniéndose el nivel en los primeros días del puerperio.
- un incremento del nivel de cuerpos cetónicos (acetona, acetato-acético, β - hidroxibutírico), que comienza a ser significativo durante los primeros 6 meses, alcanza un máximo en el tercer trimestre y disminuye rápidamente en los primeros días de estado puerperal.
- Un progresivo incremento de fosfolípidos que comienza en el primer trimestre, sin que tenga lugar una disminución significativa durante los 6 días siguientes al parto. Referente a las clases de fosfolípidos, aumenta, notablemente, la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina a expensas de fosfatidilserina y fosfatidilinositol.
- Incremento de las β -lipoproteínas, desde el segundo trimestre, alcanzándose el máximo en los tres últimos meses; disminuye el nivel durante los 3 días siguientes al parto.

Interpretando estos hechos a la luz de los conocimientos actuales, se puede concluir que durante la gestación se moviliza una gran cantidad de lípidos. El aumento de ácidos grasos no esterificados, glicéridos, fosfolípidos y β - lipoproteínas en plasma, apoya la hipótesis de la existencia de una "hiperlipemia de transporte", inducida por un aumento de lipólisis en el tejido adiposo. Esta interpretación también parece válida para explicar la hipercolesterolemia e hipercetonemia, ya que elevados niveles de ácidos grasos no esterificados en plasma incrementan la oxidación periférica de los ácidos grasos y, por tanto, la formación de acetyl-CoA. Considerando que este metabolito es un precursor del colesterol y de los cuerpos cetónicos, y que su entrada en el ciclo de Krebs

está reducida durante la gestación (debido a la baja utilización de glucosa), se comprende que elevados niveles de ácidos grasos libres conduzcan a la biosíntesis de ambos metabolitos.

Si bien estos fenómenos de hiperlipemia plasmática gestacional tienen lugar en la mayoría de las especies ocurre exactamente lo contrario en el caso del conejo y del cobaya (Popjak, 1.946); ambas especies desarrollan una profunda hipolipemia, referente a casi todas las clases de lípidos plasmáticos, hacia el final de la gestación. Esta enorme disminución en el contenido de lípidos plasmáticos fué atribuida por Baumann y Holly (1.925-26) a una utilización rápida de los lípidos maternos por el feto, durante el periodo de su máximo crecimiento; sin embargo, el grado de hipolipemia es independiente del número de fetos que contiene la madre, por lo que la anterior hipótesis no resulta satisfactoria. Probablemente deba de ser atribuida a determinadas influencias hormonales que se desarrollan durante la gestación (Popjak, 1.954).

En mono rhesus se presenta una hipolipemia, con un aumento de ácidos grasos y triglicéridos, sólo al final de la gestación (Roux et al., 1.974).

1.7.2 INFLUENCIAS HORMONALES

Con vistas a dilucidar los mecanismos que, durante la gestación, conducen a la aparición de una hiperlipemia de transporte así como al considerable incremento de la lipólisis, se estudiaron las modificaciones de los niveles de glucosa y ácidos grasos libres de plasma después de la administración de glucosa, insulina, glucosa mas insulina, fructosa. fructosa 1-6P, epinefrina y norepinefrina, a mujeres gestantes a partir del tercer trimestre de gestación así como a mujeres control (Froesch et al., 1.962; Froesch, 1.965; Grinsberg, 1.965; Lind et al., 1.973).

De estos estudios se deduce que, en condiciones de disponibilidad de glucosa, la lipólisis disminuye menos en mujeres gestantes que en controles, observándose además que este efecto no es debido a una reducción en la utilización de glucosa por las células adiposas sino mas bien a una hipersensibilidad de las lipasas del tejido adiposo a conocidos agentes lipolíticos (catecolaminas).

Por otra parte, además de los cambios observados en el metabolismo lipídico se producen alteraciones en el metabolismo de la glucosa que consisten, principalmente, en una disminución de la tolerancia por la hexosa y en una resistencia a los efectos de la insulina (Bleicher, 1.964; Benjamin, 1.960; Velasco, 1.966; Lind, 1.973). Los estudios realizados por Knopp y Col., (1.973) en tejido adiposo de rata gestante, ponen de manifiesto que la hiperfagia e hiperinsulinismo maternos son característicos de la segunda mitad de la gestación; dentro de este periodo se han identificado dos fases metabólicas distintas: inicialmente, la acumulación de grasa se ve aumentada por conversión de glucosa a ácidos grasos de triglicéridos y una disminución de la liberación de ácidos grasos, ya que las necesidades fetales y placentales son mínimas en este periodo; posteriormente, y hasta el final de la gestación, se deteriora progresivamente la efectividad de la insulina materna, reduciéndose de forma considerable la síntesis de ácidos grasos de triglicéridos a partir de glucosa y movilizándose los depósitos de grasa materna de forma creciente como ácidos grasos libres. Estos hechos están estrechamente sincronizados con el crecimiento de la unidad feto-placentale indican que la acumulación de grasa materna, hacia la mitad de la gestación, resulta del incremento de la toma de alimento y de la insulina del plasma; sin embargo, pese a la continua hiperfagia e hiperinsulinismo hasta el final de la gestación, el depósito de grasa materno disminuye como consecuencia de un descenso en la respuesta del tejido adiposo a la insulina; este mecanismo puede considerarse como una adaptación para el crecimiento fetal, de modo que la glucosa ingerida es derivada hacia la circulación fetal; al mismo tiempo, los lípi

dos almacenados previamente son movilizados para proporcionar a la madre una fuente de energía en sustitución de la glucosa.

Con respecto a las influencias, durante la gestación de conocidos agentes lipolíticos, la mayoría de los autores admiten la existencia de una hipersecreción de STH (Gemzell et al., 1.955; Laron et al., 1.967) y del tiroides (Barnes, 1.965), así como un incremento significativo de cortisona (Martin et al., 1.968; Bro-Rasmussen et al., 1.962; Fairweather, 1.971). Las determinaciones individuales de cortisol en plasma demostraron que la corteza adrenal segrega una gran cantidad de hidrocortisona y que el cortisol libre alcanza niveles mas elevados que en estado normal (Doe et al., 1.960; Gastrapay, 1.968; Fairweather, 1.971).

Referente a los niveles de catecolaminas en plasma no hay acuerdo en la literatura, son normales para algunos autores, (Israel et al., 1.959), y se elevan según otros (Leone et al., 1.958).

Por otra parte Spoto, (1.962) aduce que no existen pruebas consistentes de que, a lo largo de la gestación, se produzca una hiperactividad del sistema nervioso simpático. No obstante, parece que la gestación modifica de diferentes formas, el equilibrio neuro-vegetativo de varios órganos, por lo que no se puede excluir la posibilidad de un hipertono simpático en torno al tejido adiposo, que conduciría, como se sabe a una estimulación de los glicéridos.

Se puede concluir por tanto que a parte de los factores intrínsecos de la célula adiposa, la lipólisis se puede explicar mediante las modificaciones del sistema endocrino que tienen lugar durante la gestación.

Por último no hay que olvidar la gran influencia de la placenta en las modificaciones del metabolismo lipídico. Josimovich (1.962) y Kaplan (1.964), aislaron de dicho órgano una hormona-somatotropina coriónica- que alcanza su máximo de concentración durante los tres últimos meses de la gestación humana. Esta hormona,

similar a la hormona del crecimiento, contribuye a potenciar los efectos lipolíticos y antiinsulínicos de la gestación. Knopp et al (1.973), en sus experiencias, mencionadas mas arriba, sobre tejido adiposo de rata gestante, ponen de manifiesto que, durante la segunda parte de la gestación se libera esta hormona placentaria, provocandose una acción antagónica a la insulina, que trae como consecuencia un aumento en la movilización de ácidos grasos libres asi como una disminución en el consumo de glucosa que es, a su vez, utilizada por el feto.

En tal situación endocrina, la actividad funcional de los islotes de Langerhans no puede dejar de verse afectada; de hecho Quinto y col. (1.964) observaron una actividad basal mas elevada, una hiperplasia e hipertrofia de los islotes con el consiguiente aumento de insulina en el plasma. Otros autores (Lind et al., 1.973; Picard, 1.967; Freinkel, 1.964) concluyeron que, despues de una administración de glucosa, el nivel de insulina se eleva más en mujeres gestantes que en normales y que existe, a su vez, un consumo mucho mas rápido de la hormona, relacionado con una degradación de ella, por las enzimas proteolíticas, sobre todo de la placenta ("insulinasa").

Todas las modificaciones metabólicas de la gestación podrían explicarse aceptando la teoria de Randle sobre la función del ciclo "glucosa-ácidos grasos" (Randle et al., 1.965, 1.966). De acuerdo con esta teoria, bién basada en hechos experimentales, el equilibrio entre estas dos sustancias energéticas seria el resultado de un mecanismo de autoregulación mediante el cual, mientras que por un lado la utilización de glucosa inhibe la lipolisis y la oxidación de ácidos grasos libres en el músculo, por otro, la movilización y utilización periférica de ácidos grasos, reduce el metabolismo de la glucosa a nivel de dicho tejido y, al menos en estados diabéticos, también a nivel de la célula adiposa.

Aunque este ciclo podría asegurar la homeostasis sin intervención del sistema endocrino, es evidente que algunas hormonas

pueden afectar su función . La insulina reduce la lipólisis en tejido adiposo y músculo, aumentando la esterificación de los ácidos grasos, mientras que las hormonas antiinsulínicas estimulan la lipolisis. De acuerdo con Randle, el efecto inhibitorio de estas hormonas sobre la utilización periférica de glucosa no sería un fenómeno debido a una interferencia con los sistemas enzimáticos musculares implicados, sino a una simple consecuencia de sus propiedades "lipomovilizantes"; de esta forma las relaciones entre las modificaciones de los metabolismos de glucosa y lípidos durante la gestación, deberán interpretarse de diferente manera. En efecto, los cambios en el metabolismo de la glucosa estarán subordinados a los del lipídico, como se pone de manifiesto por los siguientes hechos: aumento de hormonas lipolíticas, incremento de la sensibilidad de las lipasas a catecolaminas, aparición de un factor lipolítico placentario con el consiguiente incremento de la movilización de ácidos grasos libres y concentración de los mismos en plasma, que interfiere con la utilización periférica de glucosa, determinando una resistencia a los efectos glicolíticos de la insulina que traería como consecuencia la aparición de un hiperinsulinismo secundario.

1.7.3 BIOSINTESIS DE LIPIDOS.

El elevado nivel de lipólisis durante la gestación, puede parecer contradictorio con el hecho de que normalmente se incrementan las reservas de grasa durante dicho estado, no solamente en casos de exceso de dieta sino en casos de una dieta normal. Es necesario admitir, entonces, que durante la gestación las células adiposas sintetizan ácidos grasos en mayor proporción que en estado normal.

Este fenómeno sólo puede ser explicado parcialmente por el hiperinsulinismo gestacional, ya que la insulina ejerce, al mismo tiempo, efectos lipogénicos y antilipolíticos. El problema consiste, entonces, en clasificar los mecanismos a través de los cuales, en presencia de altos niveles de insulina, el tejido adiposo de

una mujer gestante incrementa su actividad lipogénica sin una disminución de la lipólisis. Se sabe que las células adiposas utilizan la glucosa mediante la ruta de Embden-Meyerhof y la ruta de las pentosas; ambas vías metabólicas conducen a la formación de dos triosas-P: gliceraldehído-P y dihidroxiacetona-P. Existe entre ambas un equilibrio que depende de la actividad de la triosa-P-isomerasa y de las velocidades de las reacciones siguientes a cada una de ellas. La contribución de ambas rutas en la utilización de glucosa se estudia incubando células adiposas con glucosa marcada radiactivamente en posiciones 1 y 6 respectivamente, habiéndose llegado a los siguientes resultados (Martin et al., 1.965; Katz et al., 1.966):

- En tejido adiposo de una mujer gestante predomina el ciclo de las pentosas sobre la ruta de Embden-Meyerhof.
- En sentido absoluto, el tejido adiposo sintetiza, a partir de ambos precursores, cantidades de ácidos grasos y glicerol superiores a los normales.
- Con respecto a mujeres control, la cantidad de glucosa metabolizada via pentosas es mayor en las mujeres gestantes, si se calcula sobre la base de síntesis de glicerol.
- La conversión de gliceraldehído-P a dihidroxiacetona-P es mucho menor que en estado normal, en las células adiposas.

Estos hechos ponen de manifiesto que existe un aumento de la lipogénesis durante la gestación; las células adiposas sintetizan mas ácidos grasos y menos glicerol a partir de glucosa, explicando, razonablemente bien el mecanismo mediante el cual el tejido adiposo de una mujer gestante puede, al mismo tiempo, incrementar sus actividades lipolíticas y lipogénicas. En efecto, si las cantidades mayores de glucosa que se utilizan por el tejido adiposo (bajo el estímulo de la insulina) se transforman en ácidos grasos mas que en glicerol, es lógico que junto a un incremento de la lipogénesis haya una falta relativa de α -glicero-P, responsable de una mayor movilización de ácidos grasos, y el alto contenido

en glicéridos de la célula adiposa podría explicar la hipersensibilidad de las lipasas a las catecolaminas.

El hígado juega un papel muy importante en el metabolismo intermediario, experimentando una serie de alteraciones durante la gestación : (Dannenburg et al., 1.964)

- La lipogénesis hepática, a partir de acetato, es superior en estado gestante que en normal.
- Cuando se utilizan pirúvico y glucosa como precursores, la actividad liposintética es igual en estado normal y gestante.
- No hay diferencias cualitativas en la utilización hepática de glucosa, que se puede detectar comparando radiactividades incorporadas en glicerol y en ácidos grasos.

Estos resultados, si bien son ciertos para la mayoría de las especies estudiadas, resultan contradictorios cuando se estudia la lipogénesis en tejidos de conejo o cobaya gestantes (Popjak, 1.964; Roux, 1.966). El estudio sobre la utilización de acetato por cortes de hígado de conejos gestantes y no gestantes proporciona una explicación para la hipolipemia gestacional; los cortes de hígado de coneja gestante utilizaron mucho menos acetato que las no gestantes; la lipogénesis reprimida en el hígado es atribuible a alguna influencia hormonal. Asimismo, Popjak y Beckmans (1.950) encontraron que la velocidad de síntesis de colesterol es inferior en conejas gestantes.

1.7.4 ACIDOS GRASOS DE PLASMA Y TEJIDO ADIPOSEO.

El término "lípidos" incluye toda una serie de sustancias diferentes en su composición química y propiedades, pero que tienen un elemento estructural común, el ácido graso.

Mediante análisis por cromatografía de gases, se ha puesto de manifiesto que, en plasma de mujeres gestantes se produce en las diferentes fracciones lipídicas, un aumento progresivo en el porcentaje de ácidos grasos saturados (sobre todo palmítico) y una correspondiente disminución de los poliinsaturados (sobre to do linoleico y araquidónico), excepto en los fosfolípidos, en los que se eleva el porcentaje de linoleico y el de araquidónico per manece invariable.

En cuanto al tejido adiposo, no se aprecian variaciones significativas durante la gestación.

En ratas se ha visto que la gestación determina, tanto en plasma como en tejidos, modificaciones similares a las observadas en humanos; sin embargo, en tejido adiposo hay una disminución significativa de linoleico. (Bergher et al., 1.964; Leake et al., 1.964; Mc Kay et al., 1.963; Degrelle-Cheymol, 1.970).

En cuanto a las influencias hormonales, los estrógenos ac tuan sobre el metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados, incrementando la esterificación, en fosfolípidos, del ácido araquidónico y favoreciendo la movilización de ácido linoleico de los depósitos. Los elevados niveles de estrógenos en plasma po- drian explicar por qué en los fosfolípidos de plasma de humanos gestantes no tiene lugar una disminución de poliinsaturados. Con siderando, además, las relaciones metabólicas entre los fosfolípi dos y los esteres de colesterol (el colesterol recibe una gran parte de sus ácidos grasos poliinsaturados de ciertos fosfolípi dos, mediante un proceso de transesterificación), la reducida con centración de ácido araquidónico en los esteres de colesterol de mujer gestante depende de una insuficiencia en el proceso de tran sesterificación, relacionada con la hipercolesterolemia gestacio nal.

El incremento de ácidos grasos saturados y la disminución de insaturados puede deberse a los siguientes hechos:

- El tejido adiposo contiene preferentemente ácidos grasos saturados; el aumento de la lipólisis produce un aumento de estos en el plasma.
- La mayor utilización de ácidos grasos libres por los tejidos maternos, quienes oxidan, preferentemente, los insaturados.
- Considerable absorción de ácidos poliinsaturados (sobre todo de los esenciales) por el feto y placenta.

1.8 PERMEABILIDAD DE LA PLACENTA. ORIGEN DE LOS LÍPIDOS FETALES.

Según el concepto ya tradicional de Mossman (1.937), se puede decir que la formación de la placenta consiste en la oposición íntima de los órganos fetales con los tejidos maternos, con el fin de facilitar los intercambios fisiológicos que han de tener lugar entre la madre y el embrión en desarrollo. En la placenta normal, al final del embarazo, puede apreciarse una parte de origen fetal (corión) y una parte materna, resultado de la transformación de la mucosa uterina (decidua basal).

La placenta es un órgano metabólicamente activo; desde el punto de vista funcional es algo más que una membrana semipermeable. Hoy sabemos que está formada por tejidos de gran actividad metabólica, y se han encontrado en ella potentes sistemas enzimáticos (Edlow et al., 1.971; Karp W. et al., 1.971; Karp, 1.971). El paso activo de sustancias nutritivas de la madre al feto requiere la intervención de enzimas que catalicen este sistema de transporte. Además es necesario también un mecanismo metabólico capaz de suministrar la energía necesaria para que estos procesos se lleven a cabo. Esta energía viene proporcionada en forma de ATP y se origina en las células, a través de los procesos normales.

Podemos considerar, además, a la placenta como reguladora del metabolismo fetal; este órgano tiene gran cantidad de glucó-

geno y un sistema enzimático capaz de transformarlo en glucosa durante la primera parte de la gestación (Demers et al., 1.973; Gabbé, 1.972); pero la reserva de glucógeno y la actividad enzimática disminuyen a medida que avanza la gestación, de tal forma que no se encuentra esta enzima en placentas recogidas a término. Ya Claude Bernard, 1.871 había atribuido a la placenta el papel de "hígado transitorio", considerando la glucosa como un importante depósito gluco-regulador, que va evolucionando a medida de que el feto va adquiriendo autonomía metabólica. Estudios recientes de Cedard (1.970), sugieren que el contenido de glucógeno en placenta a término puede ser el factor limitante en el aporte de energía para la aromatización en la biosíntesis de estrógenos. La gonadotropina coriónica puede iniciar este proceso, a través de la activación del sistema adenil-ciclasa, con la consiguiente glucogenólisis (Ferre et al., 1.972). Un estado diabético, natural o inducido, influye sobre el tamaño del feto; los fetos de animales con fuerte glucosuria son significativamente mas pequeños que los correspondientes a animales normales; estos fetos mas pequeños presentan placentas mas grandes y un contenido de glucógeno mas elevado (Pitkin et al., 1.974).

Por otra parte, considerando que durante la gestación, el metabolismo lipídico materno está estrechamente relacionado con los de placenta y feto, es importante conocer en detalle las funciones metabólicas de los lípidos placentales así como el origen de los lípidos fetales.

Mediante análisis químicos se ha demostrado que, desde el primer mes hasta el final, en humanos, se reduce el contenido de lípidos fetales de la placenta; este hecho junto con la muy elevada concentración de fosfolípidos (durante el primer trimestre sobrepasa a la del hígado), contrasta con la "hipotética" naturaleza degenerativa de las grasas en este órgano. Considerando por otra parte que los fosfatidos disminuyen en gran cantidad durante el último mes, después de haber alcanzado elevadas concentraciones en los dos primeros trimestres (cuando el feto consume gran cantidad de ellos con fines estructurales y energéticos), es razonable

50

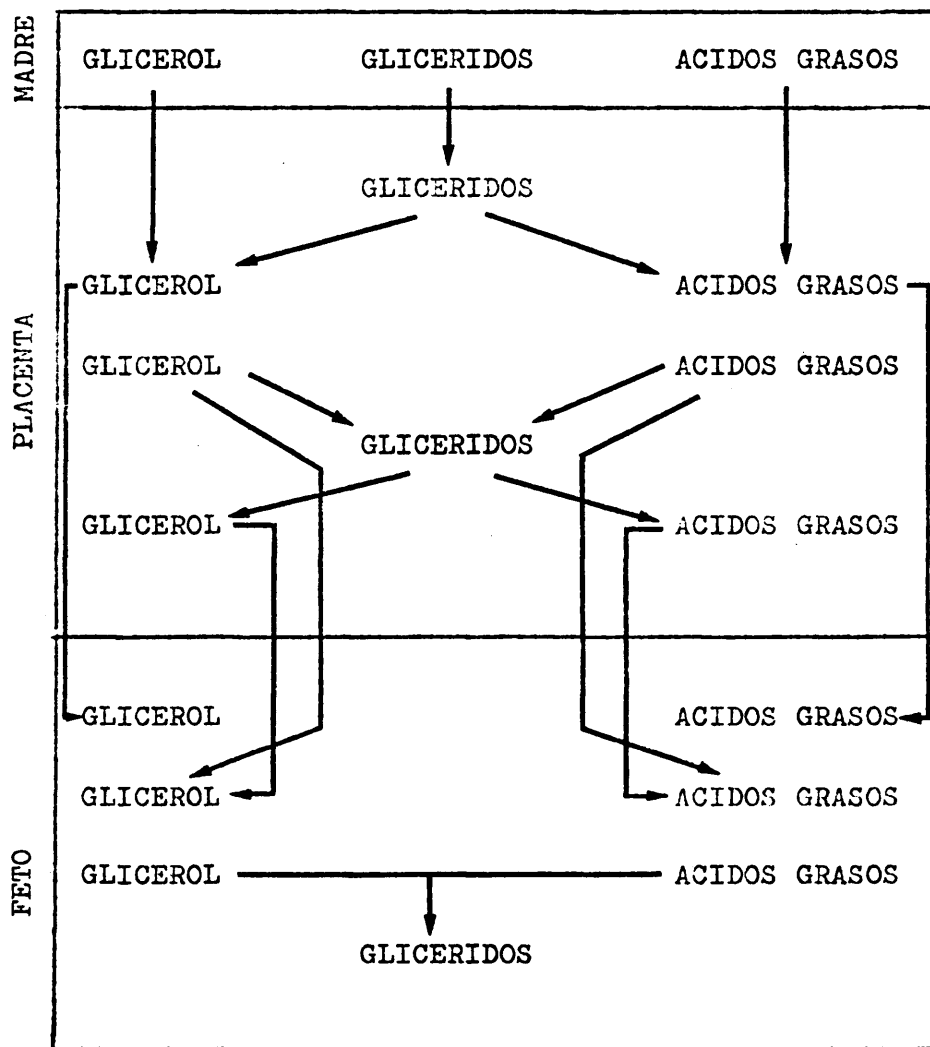
pensar que tales moléculas atraviesan la placenta desde la madre al feto, aunque no excluye, ni mucho menos, la posibilidad de una transformación, en la placenta, de los fosfolípidos maternos.

Se ha demostrado también, por análisis químicos, que entre las semanas ocho y nueve de gestación, en humanos, hay una gran acumulación de triglicéridos y una considerable disminución de ácidos grasos libres en el sincitio; si se admite que los glicéridos se elevan en el feto, después de haber sido hidrolizados en el tejido placentar, la observación anterior indica la existencia de una gran actividad hidrolítica de los elementos sincitiales y de un gran aporte de ácidos grasos al organismo fetal durante los siete primeros meses de gestación con respecto a los dos últimos, durante los cuales aparece en el feto una autonomía metabólica con una elevada capacidad de liposíntesis.

El empleo de isótopos radiactivos, en el estudio del origen de los lípidos fetales, en diversas especies animales, ha permitido establecer las siguientes conclusiones:

1.8.1 ORIGEN DE LOS TRIGLICERIDOS FETALES.

Los triglicéridos de la sangre materna son absorbidos por la placenta, hidrolizados en el sincitio y transferidos al feto como glicerol y ácidos grasos, junto con moléculas análogas sintetizadas por la placenta. El feto, a su vez, es capaz de sintetizar glicerol y ácidos grasos a partir de carbohidratos y proteínas. Se concluye, por tanto, que el organismo fetal puede sintetizar sus glicéridos a partir de precursores maternos, placentales y de origen endógeno (Figura 3).



Compuestos de origen materno

Compuestos de origen placentar

Compuestos de origen fetal

Figura 3. Origen de los triglicéridos fetales

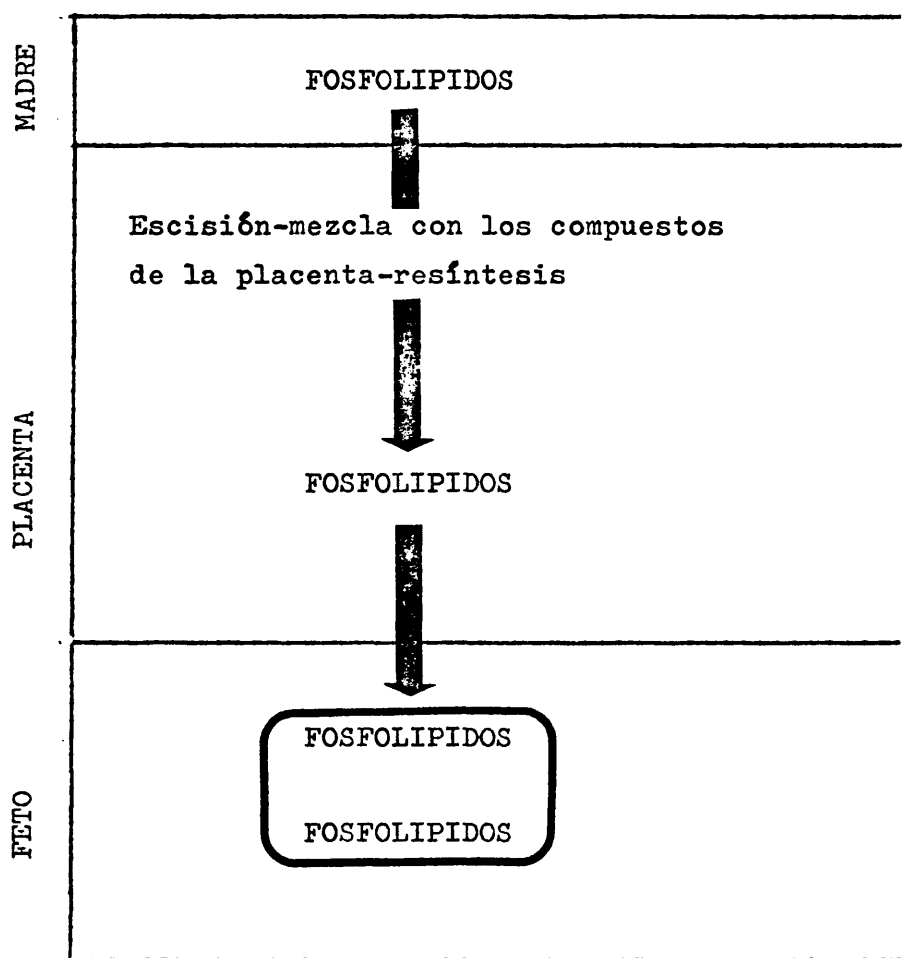
1.8.2 ORIGEN DEL COLESTEROL FETAL.

Los experimentos de Popjak (1.950, 1.954) realizados con conejos gestantes, pusieron de manifiesoto que no existe una transferencia perceptible de colesterol de la madre al feto y que el colesterol fetal es el resultado de la síntesis del mismo en los órganos fetales; conclusiones basadas del análisis de los tejidos maternos y fetales, después de la administración de D₂O y de acetaa

to- ^{14}C a conejos gestantes. Sin embargo, mas recientemente, otros investigadores encontraron que el colesterol atraviesa libremente la placenta, cuando administraban colesterol- ^{14}C a la madre (Connor et al., 1.965, 1.967; Coutts, 1.969; Plotz, 1.968). Estas observaciones divergentes se han encontrado para diferentes especies de animales. Posiblemente sean operantes ambos mecanismos: síntesis "de novo" y de origen materno; hipótesis apoyada por el hecho de que, en conejos por ejemplo, los niveles de colesterol en plasma fetal son superiores a los de plasma materno. Por otra parte, puesto que el feto crece mas rapidamente en el último periodo de gestación, es concebible que operen los dos mecanismos, con el fin de cubrir los requerimientos fetales de esteroides.

1.8.3 ORIGEN DE LOS FOSFOLIPIDOS FETALES.

Los fosfolípidos de la madre son asociados por la placenta, rotos en sus componentes y vueltos a sintetizar formando moléculas diferentes a las de la madre, debido fundamentalmente a la abundancia de ácidos grasos poliinsaturados. Las diferentes fracciones de fosfolípidos de la placenta que están en relación cuantitativa diferente de la de la madre son cedidos al feto en proporciones diferentes para cada uno de ellos, de forma que en la sangre fetal su relación permanece similar a la de la madre. Con este mecanismo, la placenta satisface el requerimiento fetal de fosfolípidos poliinsaturados, sin perjudicar el balance entre las diferentes fracciones que es indispensable para la homeostasis. No se puede excluir que, junto a los fosfolípidos de origen placentar, el feto contiene pequeñas cantidades de fosfolípidos de origen endógeno (figura 4.) (Biezenski et al., 1.971).



de origen materno
de origen placentar
de origen fetal

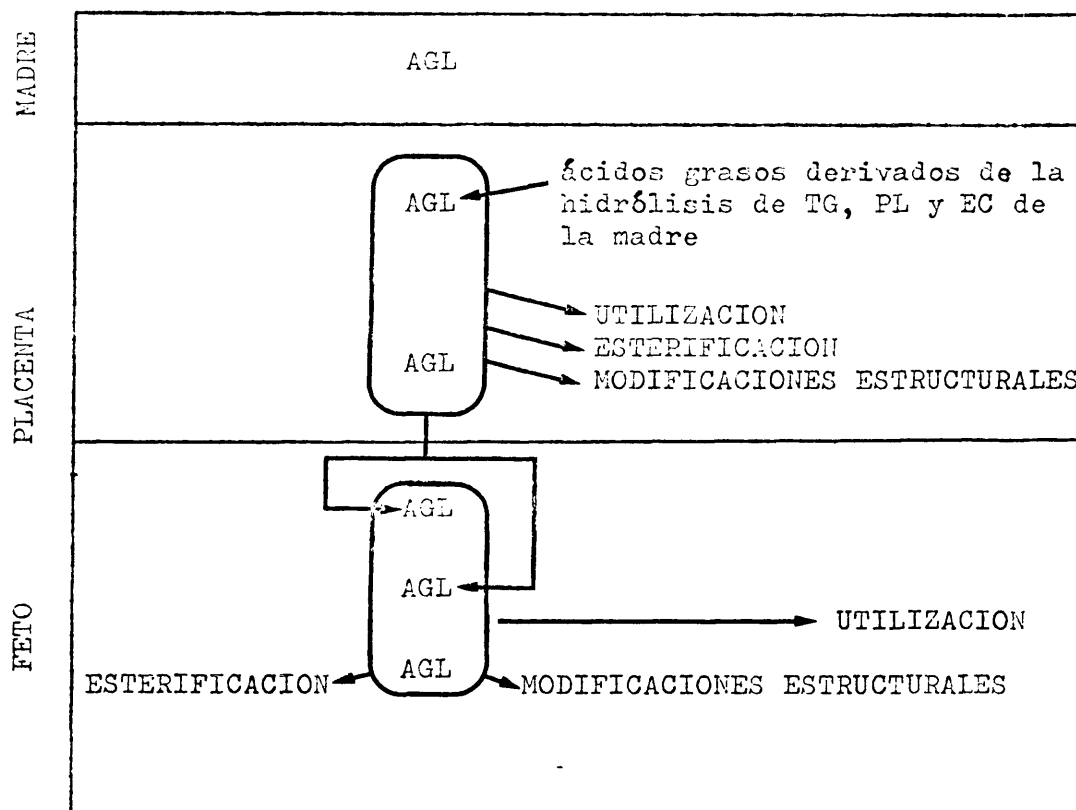
Figura 4 Origen de los fosfolípidos fetales.

Biezenski (1.969), investigando conejos, puso de manifiesto la imposibilidad del hígado fetal para sintetizar fosfolípidos de plasma: inyectando $^{32}\text{PO}_4^{-3}$ a fetos extraídos de la madre al final de la gestación observó una rápida incorporación de ^{32}P en fosfolípidos de hígado y carcasa fetales; sin embargo, no se produjo ninguna incorporación en fosfolípidos de plasma, hasta 3 horas después de la inyección. Un experimento análogo lo realizó con conejos adultos normales, obteniendo una rápida incorporación en fosfolípidos plasmáticos. La consecuencia probable es que el hígado fetal no sin

tetiza fosfolípidos de plasma hasta varias horas después. Por lo tanto, puesto que ningún ácido graso esterificado se transfiere directamente al feto (Biezenski et al., 1.971; Mc. Bride, 1.964; Biezenski, 1.962), se comprende que sea la placenta la principal fuente de fosfolípidos fetales. Biezenski, (1.971) apuntó la posibilidad de que fragmentos de fosfolípidos de origen materno pasen también a la circulación fetal incorporándose en lípidos de diferentes tejidos fetales.

1.8.4 ORIGEN DE LOS ACIDOS GRASOS LIBRES FETALES.

Los ácidos grasos del feto tienen un triple origen: materno, placentar y fetal (Popjak, 1.950; Van Duyne, 1.959, 1.962), figura 5



de origen materno

de origen placentar

de origen fetal

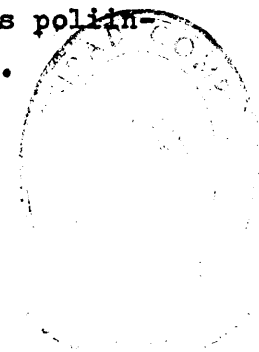
Figura 5. Origen de los ácidos grasos no esterificados fetales (AGL)

Varios investigadores encontraron la existencia de una lipoproteína lipasa placentar que es capaz de hidrolizar los ácidos grasos de los triglicéridos naturales circulantes (Mallov et al., 1.965). Por otra parte, Szabo et al. (1.973), en experimentos con perfundidos de placenta humana, demostraron que una considerable porción de ácido graso- ^{14}C era incorporado a la fracción de triglicéridos de los lípidos placentales; no es improbable, por tanto, que la transferencia de los ácidos grasos a través de la placenta incluya una reacción de esterificación transitoria (como la que ocurre en las células intestinales durante la absorción de grasa).

El transporte placentar de ácidos grasos libres varía mucho entre las especies, pero es particularmente considerable en conejo y cobaya (Van Duyne, 1.962; Mc. Bride, 1.964); el nivel de los mismos en plasma es más elevado en el feto que en la madre, al final de la gestación (Roux, 1.966), lo que sugiere una síntesis de ácidos grasos libres de plasma por parte del feto, posiblemente a partir de glucosa. En estas dos especies el fácil transporte, vía placenta, de los ácidos grasos libres, va acompañado por elevados niveles de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Mc. Bride, 1.964), lo que apunta la posibilidad de que el transporte de lípidos en las VLDL en fetos de mamíferos esté relacionado con el "influjo" de los ácidos grasos libres. La secreción hepática de VLDL en adultos es función de la captura de ácidos libres por el hígado (Havel, 1.970).

Los experimentos de Noble et al. (1.971) con corderos gestantes pusieron de manifiesto que la transferencia de ácidos grasos libres de la madre al feto, vía placenta, es relativamente baja, así como que dicho órgano no es igualmente permeable para los diferentes ácidos grasos.

Es importante tener en cuenta, por último, la importancia, al menos cualitativa, del transporte de los ácidos grasos poliinsaturados esenciales de la madre al feto (Dancis, 1.962).



1.8.5 ORIGEN DE LAS LIPOPROTEINAS DEL PLASMA FETAL.

Con respecto al transporte de las lipoproteinas a través de la placenta existen pocos estudios. En humanos, la sangre del feto tiene un contenido inferior de α -lipoproteinas y superior de β -lipoproteinas, que la madre. Sternberg (1.960), expuso la hipótesis de que la placenta sea impermeable a las β y, al menos, permeable en parte a las α .

1.9 ESTUDIOS SOBRE LAS RELACIONES HORMONALES ENTRE MADRE Y FETO.

El estudio de las posibles relaciones materno-fetales tiene una singular importancia ya que, determinados desórdenes endocrinos de la madre pueden producir daños irreversibles al feto. Que, por otra parte, podrían ser evitados si se conociesen estas interacciones.

Además de los sistemas endocrinos maternos y fetales el otro elemento esencial es la placenta, que no sólo regula el intercambio de sustancias entre los dos organismos sino que es un centro esencial en la producción de hormonas (gonadotropina coriónica, somatotropina coriónica, estrógenos).

Con respecto a la insulina parece existir acuerdo en que el feto sintetiza su propia hormona, poseyendo autonomía respecto a su producción y eliminación, ya desde las primeras etapas de la vida intrauterina (Alexander et al., 1.968a; Basset, 1.971); sin embargo, no todos los autores están de acuerdo en lo que se refiere a sus mecanismos de secreción en respuesta a conocidos estimulantes como la glucosa; no obstante, parece ser que la madurez del feto a este respecto se desarrolla en la última parte de la gestación y, en algunos casos, después del nacimiento (Willes et al., 1.968; Alexander et al., 1.968b). En cualquier caso, la placenta parece ser impermeable a la insulina (Spellacy et al.,

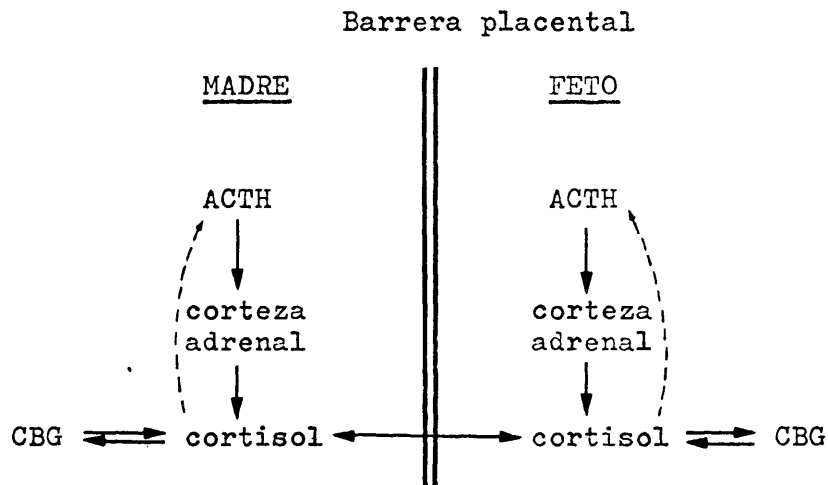
1.964; Adam et al., 1.968) al menos en hombre y en oveja, como lo demuestra la independencia de concentraciones en las circulaciones materna y fetal y la ausencia de una transferencia neta en preparaciones de placenta perfundida.

La placenta no produce ninguna hormona tiroidea, ni forma parte de este sistema endocrino; su única misión a este respecto es regular el paso entre madre y feto. La hormona estimulante del tiroides (TSH) no atraviesa, aparentemente, la placenta y la actividad del tiroides fetal depende de la elaboración de TSH por la propia pituitaria (Peterson et al., 1.952). El conocido efecto "Feed-back", homeostático, de la tiroxina en la producción de TSH también se observa en el feto. Se concluye, por tanto, que el tiroides fetal desarrolla capacidad para la completa producción de hormonas desde el principio de la gestación; esto incluye: captura de yoduro, transformación a yodo, iodización de la tirosina y producción de triiodo tironina y tiroxina. Ambas atraviesan la placenta, si bien el paso es lento para esta última.

En contraste con el tiroides, la glándula adrenal del feto es anatómicamente diferente de la del adulto y produce un conjunto de hormonas diferente desde el punto de vista cuantitativo. A partir de estudios "in vivo" e "in vitro" se deduce que la glándula fetal produce cortisol (Lamman, 1.961; Murphy et al., 1.974). En la primera parte de la gestación humana, la mayor parte del cortisol atraviesa la placenta, para transformarse en el feto en cortisona. Parece probable que la mayor parte de cortisona de suero materno, derive de la unidad feto-placentar. En otras especies como en la oveja, la placenta supone una barrera significativa en el movimiento materno fetal de cortisol. En rata, la actividad adrenocorticotrópica se inicia en los días 17 y 18 del desarrollo intrauterino (Milkovic et al., 1.973; Milkovic et al., 1.970).

Por otra parte, la ACTH materna no atraviesa la placenta y el desarrollo y función de la corteza adrenal del feto depende de la estimulación por su propia ACTH que elabora la pituitaria. El

cortisol es enlazado por proteínas de suero, la mas importante de las cuales es una globulina específica (transcortina). Durante la gestación la capacidad de suero materno para enlazar cortisol se eleva y es mayor que en el feto (Sandberg et al., 1.965); esto puede favorecer elevadas concentraciones de cortisol en sangre materna y limitar su transferencia via placenta (figura 6).



CBG= cortisol binding globulin=globulina enlazante de cortisol

Figura 6. Relaciones materno fetales adrenocorticotropicas en la producción de cortisol.

Con respecto a las hormonas sexuales, las relaciones materno fetales son mucho mas complejas; en este sentido, además del control en la distribución entre ambas circulaciones la placenta es muy activa en la producción de estas hormonas. Parece existir una interdependencia entre placenta y feto, ya que cada uno proporciona al otro precursores para la síntesis de esteroides (Bengtsson et al., 1.964; Lyons et al., 1.968; Klevit, 1.966; Aarskog, 1.969; Rivarola et al., 1.968; Pearlman et al., 1.967).

1.10 METABOLISMO LIPIDICO FETAL.

1.10.1 IMPORTANCIA DEL METABOLISMO DE LIPIDOS PARA EL FETO.

El desarrollo y diferenciación de los órganos fetales necesita de la síntesis de nuevas estructuras celulares conteniendo fosfolípidos y esteroides. En el feto humano, aproximadamente a las 20-24 semanas de gestación, se observa un desarrollo enorme del tejido adiposo, que requiere como precursores ácidos grasos y glicerol. La gran acumulación de grasa en las 6 últimas semanas de gestación (5-10gr./día) tiene lugar en el tejido adiposo del feto, lo que supone una reserva energética con vistas al incremento del consumo de energía del recién nacido, así como a su aislamiento térmico.

1.10.2 CONCENTRACION DE LIPIDOS Y COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DURANTE EL DESARROLLO.

Al final de la gestación, aproximadamente del 9-16% del peso total del feto humano son lípidos (Widdowson, 1.950); la acumulación de estos, al principio de la gestación tiene lugar con una velocidad de 28-35 gr./día, obteniéndose el máximo de 4,9 gr./día al final de la gestación. A las 10 semanas de desarrollo se puede extraer del feto 4,8 gr. lípidos/100 gr. de peso del feto (peso seco), concentración que va aumentando hasta el final del desarrollo.

Fosfolípidos y esteroides son las fracciones lipídicas que fundamentalmente se incrementan en placenta, cerebro, hígado y pulmón (Clausen et al., 1.965). Los fosfolípidos de pulmón se incrementan marcadamente entre las semanas 24-26 de gestación, lo que está de acuerdo con los descubrimientos histológicos en el feto humano; el pulmón cambia de una estructura acanalada a una alveolar y comienza a sintetizar agentes activos de superficie, como se verá mas adelante.

Entre las semanas 8 y 28 de gestación, no se observa ninguna diferencia en la composición de ácidos grasos de cerebro, pulmón, hígado y placenta; sin embargo existen diferencias significativas entre los tejidos fetales y adultos. Los fetales contienen mas palmítico y esteárico y menos oleico y linoleico que los adultos; sin embargo los fosfolípidos de pulmón contienen mucho mas oleico que el tejido adiposo adulto (Hirsch et al., 1.960).

En el feto humano existen, en sangre, menos lípidos que en sangre materna (al final de la gestación la concentración de lípidos en suero fetal es tres veces mas baja que la de la madre), y esta reducción tiene lugar en todas las fracciones lipídicas. Mediante análisis por cromatografía de gases, se han puesto de manifiesto, respecto a los ácidos grasos totales de plasma, los siguientes hechos:

- Existe un contenido menor de ácido linoleico y mayor de ácido araquidónico que en la madre.
- La presencia, en todas las fracciones lipídicas de ciertos ácidos grasos poliinsaturados, de cadena larga que no son detectables en plasma materno.
- Una menor concentración de ácido linoleico en fosfolípidos, esterios de colesterol y glicéridos, así como un contenido mayor de eicosatrienoico en glicéridos y ácidos grasos libres.

Una de las razones que pueden tener esta serie de resultados es que el origen de los lípidos fetales, en las etapas previas de la gestación, esté en los ácidos grasos maternos que atraviesan la placenta, y que, a medida que avanza la gestación se va realizando una evolución hacia la síntesis "de novo" a partir de glucosa, que como se sabe, es uno de los metabolitos clave para el desarrollo fetal (Roux et al., 1.967).

La velocidad de transformación de linoleico en araquidónico es muy grande, que junto con la presencia de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, parece indicar una situación meta-

bólica similar a la que se observa en animales con dieta libre de grasas.

A pesar de que el feto, al final del desarrollo intrauterino, parece poseer una autonomía lipometabólica, ésta es incompleta y no incluye los ácidos grasos esenciales; así, el organismo fetal parece estar en un estado de deficiencia latente, demostrado por el hecho de que a pesar de la notable interconversión de linoleico en araquidónico, tiene lugar una deficiencia de vitamina F; por ello cualquier disminución en sangre materna de estos ácidos grasos (diabetes y otros estados patológicos), así como cualquier alteración en el mecanismo mediante el cual estos compuestos son transferidos, vía placenta, acarreará el daño consiguiente para el feto.

Los ácidos grasos libres se liberan en grandes cantidades en la circulación del recién nacido (Roux, 1.967; Van Duyne, 1965); esta liberación es, probablemente, secundaria a los cambios ambientales que ocurren después del nacimiento. Al nacer, se estimula el sistema nervioso simpático del feto, con la consiguiente liberación de ácidos grasos, que son utilizados por él como fuente de energía.

Existen diferencias considerables entre las especies, tanto en la composición como en la concentración de lípidos fetales. Como en el hombre, el conejo, cobaya, incrementan su contenido de lípidos en tejidos a lo largo de la vida intrauterina. La concentración de ácidos grasos libres en suero de feto de conejo y cobaya es más alta que la de la madre (Roux, 1.966; Hershfield et al., 1.968).

El feto de cordero, por el contrario, contiene menos lípidos que la madre (Body et al., 1.966). La concentración de lípidos en hígado de rata, ratón y cerdo, muestra un considerable incremento inmediatamente después del nacimiento, mientras que lo contrario ocurre en conejos (Roux, 1.966; Morikawa et al., 1.965 y 1.966; Mersmann et al., 1.973).

El tejido adiposo humano está bien desarrollado al nacimiento, mientras que en mono rhesus está prácticamente ausente.

1.10.3 BIOSINTESIS DE LIPIDOS.

Popjak (1.946, 1.950, 1.954), demostró que tanto en conejo como en cobaya, los tejidos fetales eran capaces de sintetizar ácidos grasos, colesterol y fosfolípidos y sugirió que el depósito de lípidos en el feto se debía, probablemente, no a un aumento en la velocidad de síntesis sino mas bien, a una disminución o ausencia del proceso degradativo. Mas recientemente, Roux (1.966) y Beall (1.973), estudiando el metabolismo de lípidos "in vitro" en feto de conejo, encontraron que la velocidad de incorporación de ^{14}C en colesterol, triglicéridos y fosfolípidos disminuye desde el día 20, hasta el final de la gestación.

Las observaciones de Popjak, fueron posteriormente corroboradas en otras especies tales como cerdo, rata, ratón, mono y hombre (Fain et al., 1.966; Roux, Grigorian y Takeda, 1.967; Scott et al., 1.967; Smith et al., 1.970; Roux et al., 1.974; Alexander et al., 1.968a).

Villee et al. (1.961), demostró que los tejidos fetales humanos pueden, tanto al principio como al final de la gestación, incorporar glucosa, fructosa, acetato, citrato y aminoácidos a lípidos, "in vitro" y que la velocidad de lipogénesis fetal es superior a la del adulto.

Ha sido opinión común, hasta hace poco, que los hidratos de carbono eran los únicos precursores de los lípidos fetales. Se ha puesto de manifiesto, sin embargo, que tanto "in vivo" como "in vitro", tiene lugar una transferencia de ácidos grasos y colesterol maternos a través de la placenta y que estos son incorporados a los lípidos fetales. Experimentos realizados con tejidos fetales humanos en las semanas 12 y 16 de gestación, pusieron de manifiesto que el palmítico ^{14}C se transforma en esteres de colesterol y

fosfolípidos, en todos los tejidos estudiados. Se puede concluir, por tanto, que los tejidos fetales tienen capacidad para transformar ácidos grasos y glucosa en lípidos (Fain et al., 1.966; Scott et al., 1.967; Smith et al., 1.970; Villee et al., 1961).

El cerebro fetal puede utilizar glucosa para la síntesis de lípidos (Sperry, 1.962), pero el hecho de que el palmítico pueda entrar en el tejido cerebral y convertirse en lípidos y esteroides, pone de manifiesto la posibilidad de una ruta alternante. El cerebro de feto es mas permeable a las sustancias biológicas que el del adulto. Es por tanto posible que incorpore ácidos grasos del torrente sanguíneo a lípidos, lo que podría ser particularmente importante desde el punto de vista de que, de esta forma, el cerebro fetal puede obtener ácidos grasos esenciales que el hígado fetal no puede sintetizar.

El estudio del metabolismo lipídico pulmonar a nivel fetal reviste particularísima importancia desde que se descubrió que un fosfolípido - la dipalmitoil lecitina - es el responsable de las características de actividad superficial que posee el pulmón, y se vió que la principal causa de muerte en los fetos prematuros era atribuible a anomalías respiratorias debidas a un pulmón inmaduro cuya característica era, precisamente, la falta de actividad superficial.

Naturalmente, no toda la lecitina presente en el pulmón normal es agente activo de superficie; Gluck (1.967a) separó lecitinas activas de las no activas, del parénquima pulmonar del feto de conejo, antes del día 29 de gestación que es cuando aparece la lecitina con actividad superficial en el fluido alveolar. El parénquima residual de pulmón contiene el mencionado tipo de lecitina, lo que pone de manifiesto el posible almacenamiento de la misma en las células de pulmón fetal, mucho antes de su aparición en los espacios alveolares.

El pulmón fetal es un órgano inmaduro hasta practicamente el término de la gestación; durante el periodo intrauterino, sólo

73

el 10% de la lecitina del fluido alveolar es "activa"; cuando el pulmón comienza a "respirar", la proporción de ella se incrementa rápidamente, dependiendo la velocidad de síntesis de lo avanzado de la gestación, hasta llegar a un 50% de la lecitina total en el feto a término, que es, aproximadamente, la proporción que existe en el fluido alveolar de conejo adulto. Los conejos nacidos prematuramente (28 días de gestación), presentan deficiencias respiratorias, observándose que el porcentaje de fosfolípidos "activos" en el fluido alveolar se incrementa mucho mas lentamente que en los nacidos en día normal.

Gluck (1.967 b), estudió la biosíntesis de fosfolípidos en pulmón de feto de conejo, utilizando precursores radiactivos, y observó que tienen lugar las mismas rutas que las conocidas en animales adultos, para la síntesis "denovo" de lecitina y fosfatidiletanolamina. En las rutas estudiadas "in vitro", la incorporación de CDP-colina fue sin duda el mecanismo mas importante en la síntesis de lecitina, si bien la reacción de metilación a partir de fosfatidiletanolamina y S-adenosil metionina mostró un máximo significativo en el comienzo de la viabilidad del feto.

Realizando estudios comparativos, se puso de manifiesto que en feto sin respiración, el incremento de lecitinas se produce fundamentalmente en el parénquima pulmonar, mientras que en el fluido alveolar, el incremento es mínimo. Sin embargo, cuando el pulmón lleva una hora respirando se produce en los alveolos un incremento en lecitinas 3-5 veces superior al producido en pulmón fetal sin respiración. Asimismo, se observó que la fracción de lecitina con actividad de superficie se incrementó unas 20-30 veces más en fluido alveolar de pulmón con respiración que en el correspondiente tejido fetal sin respiración. Estos resultados ponen de manifiesto, como se mencionó mas arriba, la existencia de un almacenamiento intracelular de lecitinas activas, previamente a su aparición en los alveolos, produciéndose la descarga de estos cuando comienza la respiración. Parece ser que en feto de conejo estos importantes cambios fisiológicos-metabólicos tienen lugar a partir del día 28 de gestación.

Mediante el estudio de distribuciones posicionales de ácidos grasos en las posiciones 1 y 2 de las lecitinas, se llegó a la conclusión de que la actividad superficial está relacionada con un elevado porcentaje de ácidos grasos saturados en la posición 2 (además de en la posición 1, que es lo que generalmente ocurre) y concretamente de ácido palmítico. Sin embargo, otros ácidos grasos saturados, como el mirístico, parecen tener significación ya que, según los experimentos de Gluck, se incrementa en feto de conejo a término, en un 17% en la posición 2 de las lecitinas activas; asimismo, observó, por último, que a los dos días del nacimiento se alcanza cierto estado estacionario, cuando la composición de las lecitinas se hacen similares a las de conejo adulto.

Artom (1.968) estudió las enzimas de la biosíntesis de lecitinas via CDP-colina, en rata, y vió que alcanzan su mayor actividad en el momento del nacimiento, estando de acuerdo con otros trabajos realizados con el mismo material biológico (Weinhold, 1.968; Zachman, 1.969). Gluck (1.971) estableció que la ruta de la CDP-colina es activa después de 35 semanas de gestación en humanos. Asimismo, Zachman (1.972) sugirió que la ruta via S-adenosil metionina para la síntesis de lecitinas en niños recién nacidos no tiene significación en pulmón y que únicamente en hígado tiene un significado cuantitativo.

No hay que olvidar la posible importancia de la contribución del mecanismo de desacilación-reacilación en la biosíntesis de lecitinas activas (Veryken, 1.972) a lo largo del desarrollo fetal, si bien parece poseer mayor importancia en el adulto, con vistas al mantenimiento de una concentración idónea de agentes activos de superficie pulmonares.

Por otra parte, no está todavía muy claro si la respiración intrauterina es un fenómeno anormal o, por el contrario, ocurre espontáneamente y es esencial para el desarrollo normal del pulmón; desde luego, por lo que se sabe hasta ahora, parece depender de las especies. En el feto de conejo, por ejemplo, se observan movimien-

tos respiratorios al final de la gestación, y lo mismo en fetos de oveja (Dawes, 1.972). Sin embargo, en rata, gato y cobaya no se observa respiración intrauterina (Klein et al., 1.973).

Por último, es interesante resaltar la importancia del estudio de la concentración de fosfolípidos en el líquido amniótico en relación, o como predicción de la madurez fetal, desde que se sabe que el fluido del pulmón fetal pasa al fluido amniótico (Gluck L, 1.972; Whitfield, 1.972). El descubrimiento por Gluck et al. (1.971) de que la relación entre lecitinas con actividad superficial y esfingomielina (L/S) en el fluido amniótico, aumentaba con la edad de la gestación, ha demostrado ser de gran importancia en la predicción del riesgo de "respiratory distress syndrome" (RDS)". Varios grupos de trabajo han demostrado que la relación L/S es un método válido para la determinación de la madurez del pulmón fetal, al menos en gestaciones no complicadas (Borer et al., 1.971; Spellacy et al., 1.972; Bryson et al., 1.972). Sin embargo, otros grupos, utilizando esta técnica, encuentran poca relación entre L/S y RDS (Gudson et al., 1.972; Nelson, 1.972). Asimismo, Roux (1.971) ha cuestionado que esta relación sea real y cree que la relación es puramente accidental y pone en duda que la concentración de lecitina en el fluido amniótico este relacionada directamente con la síntesis de sustancias activas de superficie, por parte del pulmón fetal.

1.10.4 DEGRADACION DE LIPIDOS.

Roux et al. (1.974) estudiaron el metabolismo "in vitro", de ácido palmítico $-^{14}\text{C}$ y glucosa $\text{U}-^{14}\text{C}$ en tejidos de mono rhesus, durante el desarrollo, y observaron que un porcentaje de ellos se cataboliza a $^{14}\text{CO}_2$; no obstante, en los tejidos fetales el nivel de degradación a CO_2 es bajo.

Villee et al. (1.958), obtuvo el porcentaje de rotura de lípidos, midiendo la producción de CO_2 respiratorio cuando incubaba hígado fetal humano con lípidos radiactivos marcados. Flaccen

ta, cerebro, pulmón e hígado de fetos humanos de 12-13 semanas catabolizan palmítico a CO_2 . El cerebro fue el que tuvo la producción mas baja de CO_2 , al contrario que hígado y placenta que tuvieron máxima. Roux et al. (1.974) observaron que en un cerebro de mono rhesus la síntesis de lípidos disminuye después del nacimiento, aunque la utilización de glucosa y producción de CO_2 a partir de ella, se incrementan.

Estas observaciones indican que los tejidos fetales oxidan el palmítico a CO_2 mediante la acción catalítica de las enzimas de la α , β u ω oxidación en conexión con el ciclo tricarboxílico. Aunque es difícil estimar el "pool" de ácidos grasos endógenos, el bajo nivel catabólico del cerebro sugiere un preferencial anabolismo de ácidos grasos, una baja permeabilidad celular, o bien, una baja utilización. Asimismo, la rotura de los ácidos grasos y su transporte dentro y fuera de la mitocondria son efectuados por las enzimas de la β -oxidación y la carnitin-palmitil-transferasa, que está presente en la placenta al final de la gestación (Karp et al., 1.971; Karp, 1.971). Todas estas evidencias demuestran que los tejidos fetales pueden catabolizar los ácidos grasos como los tejidos adultos.

1.10.5 INFLUENCIAS HORMONALES DURANTE EL DESARROLLO FETAL.

Hay evidencia considerable de que, durante el desarrollo, los órganos endocrinos del feto controlan el metabolismo de lípidos.

Cuando se decapitan quirúrgicamente fetos de conejo o rata en varios tiempos del desarrollo, se observa que a pesar de ello el cuerpo continúa creciendo normalmente hasta el final de la gestación (Bearn et al., 1.967; Picon, 1.968), observándose en los animales sin hipófisis y sin tiroides un mayor contenido en lípidos que los controles (principalmente triglicéridos y colesterol). Sin embargo, este efecto no era observado, según Jost et al. (1958) si se inyectaba, al feto, tiroxina en el momento de la decapita-

ción. Estos datos demuestran que, tanto la pituitaria como el tiroides, controlan el metabolismo lipídico fetal y que dicho control puede tener lugar a través de las conocidas actividades de la pituitaria y el tiroides, o bien, por algún agente lipolítico producido en la pituitaria; por otra parte, las correspondientes hormonas maternas, aun cuando puedan atravesar la placenta, no compensan la falta de ellas en el feto (Bearn et al., 1.961); tanto es así que el incremento de grasa en fetos humanos anormales es debido a alteraciones hormonales en ellos; así, la pituitaria de los anancefálicos está reducida de tamaño y, secundariamente a esto, las adrenales son extremadamente pequeñas.

El contenido de fosfolípidos en cerebros de feto de conejo no se afecta por la administración, a la madre, de metil tiouracilo, a pesar de que esta sustancia atraviesa la placenta e inhibe la secreción fetal de tiroxina (Cuaron et al., 1.963). El por qué de esta discrepancia aparente se debe, posiblemente, a que las células cerebrales de feto que sintetizan los fosfolípidos, no son foco de acción de la tiroxina, en útero. En humanos se ha visto también que la pituitaria y adrenales fetales controlan el depósito de tejido adiposo.

Puesto que la síntesis de lípidos depende de la glucosa y de la disponibilidad de ácidos grasos en el tejido, son importantes las acciones de la insulina, glucagón y hormona del crecimiento.

Se ha observado que la insulina está presente en el páncreas del feto humano, ya en el primer trimestre de gestación (Schwartz, 1.968). Las investigaciones sobre el funcionamiento celular de los islotes pancreáticos fetales y de recién nacidos en una gran variedad de especies: rata (Heinze et al., 1.971); oveja (Willes et al., 1.969) y monos rhesus (Mintz, et al., 1969) ponen de manifiesto que los islotes pancreáticos fetales son insensibles a la estimulación glucémica y que la adaptación del recién nacido a la vida extrauterina va acompañada de la aparición

de la liberación de insulina, estimulada por glucosa. Por otra parte, los resultados de varios estudios sugieren una relación entre el sistema adenil ciclasa de los islotes fetales y la liberación de insulina estimulada por glucosa. Así, Chez et al. (1.971), pusieron de manifiesto que la administración intravascular de teofilina y glucosa juntas a feto intacto de macaco "in vivo" va acompañada de un aumento en los niveles de insulina en el plasma fetal, mientras que glucosa o insulina juntas son incapaces de producir este efecto. A los mismos resultados se llegó, también, con otras especies (Milner et al., 1.973; Sodoyez-Goffaux et al., 1.971; Milner, 1.969a; Milner et al., 1.972). Aunque como ya se ha mencionado, se posee amplia información sobre la presencia de insulina en el páncreas desde una etapa temprana de la vida intrauterina (Milner et al., 1.971; Milner, 1.969b), se sabe poco acerca de los mecanismos que controlan su secreción. Chez et al. (1.971), han postulado que en los islotes fetales, o está disminuida la actividad de adenil ciclasa o aumentada la de fosfodiesterasa, o ambas cosas a la vez, explicando así el fallo aparente de la glucosa para inducir la liberación de insulina. Ahora bien, se dispone actualmente de una evidencia considerable en el sentido de que es muy improbable que la glucosa ejerza su efecto insulinogénico solamente por provocar la acumulación intracelular de AMP-c (Brisson et al., 1.972). Cualquiera que sea el mecanismo de insensibilidad del feto a la glucosa parece ser selectivo para este azúcar, ya que la administración de glucagón, tolbutamida y mezclas de aminoácidos a fetos humanos y de primates van asociados a una liberación de insulina, indicando que el mecanismo de su secreción está intacto.

Es posible que alteraciones en el metabolismo intermedio de la glucosa en las células de los islotes pancreáticos, combinadas con un incremento en los niveles de AMP-c en dichas células, estén directamente relacionadas con la aparición de la liberación de insulina, medida por glucosa. Así Heinze et al. (1.971), han observado que el metabolismo de glucosa en células de islotes pancreáticos de feto y recién nacido, en rata, está alterado, ob

servandose un aumento relativo del ciclo de las pentosas, que tiene lugar coincidiendo con la liberación de insulina mediada por glucosa en el recién nacido de 1-2 días, etapa en la que se observó un incremento muy significativo de AMP-c y fosfodiesterasa (Mintz et al., 1.973).

Alexander et al. (1.969) y otros investigadores encontraron que en feto de oveja si existe una liberación de insulina en respuesta a una inyección intravenosa de glucosa, si bien dicha liberación sufría un retardo con respecto al azúcar.

También ha sido detectada en sangre fetal la hormona de crecimiento, con una mayor concentración en la sangre venosa; es presumible que sea segregada por la pituitaria fetal (Yen, 1.965). Sin embargo la respuesta de la hormona de crecimiento fetal a conocidos estímulos, es mínima; así, una inyección directa de insulina a feto de mono rhesus no produce liberación apreciable de la hormona de crecimiento, y tampoco produce efecto una hipoglucemia fetal (Mintz et al., 1.969). Estas observaciones indican que, como en el caso de la insulina, a pesar de que los órganos endocrinos fetales producen hormonas similares a las del adulto, su regulación durante el desarrollo intrauterino es muy diferente a la observada después del nacimiento.

Smith et al. (1.974) estudiaron el efecto del cortisol sobre las células de pulmón de feto de conejo en cultivo, entre los días 20-28 de gestación, centrandose fundamentalmente en dos aspectos: a) crecimiento celular, determinado por el contenido en DNA, después de 72 horas; en este momento todos los cultivos estaban en fase de crecimiento exponencial y b) madurez celular, medida por la incorporación de palmítico ¹⁴C en lecitinas saturadas y su liberación al medio de cultivo. El cortisol incrementa el crecimiento celular pulmonar de feto al principio de la gestación, y a medida que se acerca al término, estimula la maduración y detiene el crecimiento celular.

En general, la administración de esteroides, con diferentes actividades glucocorticoides, acelera el proceso de maduración del pulmón fetal (de Lemos et al., 1.970; Kotas et al., 1.971; Taensch et al., 1.972; de Lemos et al., 1.973).

Por último, Menon et al. (1.973), estudiaron las actividades de adenil ciclasa en varios tejidos fetales humanos y vieron que los requerimientos de dicha enzima son similares a los de los adultos. De todos los tejidos investigados, el corazón (tejido ventricular) fué el que tuvo una actividad enzimática superior y asimismo, este tejido fué el de mayor capacidad de respuesta a la estimulación hormonal. Aunque todas las adenil ciclasas procedentes de los diferentes tejidos se estimularon por F-, la influencia hormonal fué observada únicamente en hígado, glándula adrenal y corazón. La presencia de sistemas adenil ciclasa que son sensibles a hormonas sugiere que el AMP-c puede estar relacionado con la expresión genética.

2. M A T E R I A L E S Y M E T O D O S.

2.1. MATERIAL BIOLOGICO.

Toda la experimentación se ha llevado a cabo con conejas hembras, de raza neozelandesa blanca (3,0-3,5 Kg. de peso y 4-6 meses de edad), mantenidos en jaulas independientes, en una habitación debidamente acondicionada a 22-26°C. de temperatura. La alimentación se realizó siempre con un pienso común para conejos (UFAC, tipo L.30), el agua fué administrada a discreción.

Los estudios se han realizado en 4 series diferentes de animales: control, no gestante tratado con insulina, gestante normal y gestante tratado con insulina. La edad de gestación ha sido siempre exactamente conocida. Las experiencias se han realizado a lo largo del periodo de gestación, hasta el día 29 de la misma, en que los animales son sacrificados (el alumbramiento se produce en los días 30-31 de gestación).

Las figuras dadas como representación gráfica de los resultados son siempre el valor medio obtenido de cuatro animales sometidos a idéntico tratamiento.

2.2 ADMINISTRACION DE INSULINA.

Se utilizó insulina cristalina, libre de glucagón (Nordisk Insulinlaboratorium, Copenhagen, 28,5U/mg. de material anhidro).

La administración a los animales tratados se realiza por vía subcutánea, inyectando una dosis de 1,0U disuelta en agua estéril/día/animal, a partir del séptimo día correspondiente al comienzo de la gestación y a lo largo de todo el periodo de la

misma. La administración a los animales no gestantes se hace coincidir con los mismos días ya que las experiencias se llevan a cabo simultáneamente en todos los tipos diferentes de animales.

2.3 ANALISIS CUANTITATIVO DE LIPIDOS DE SUERO.

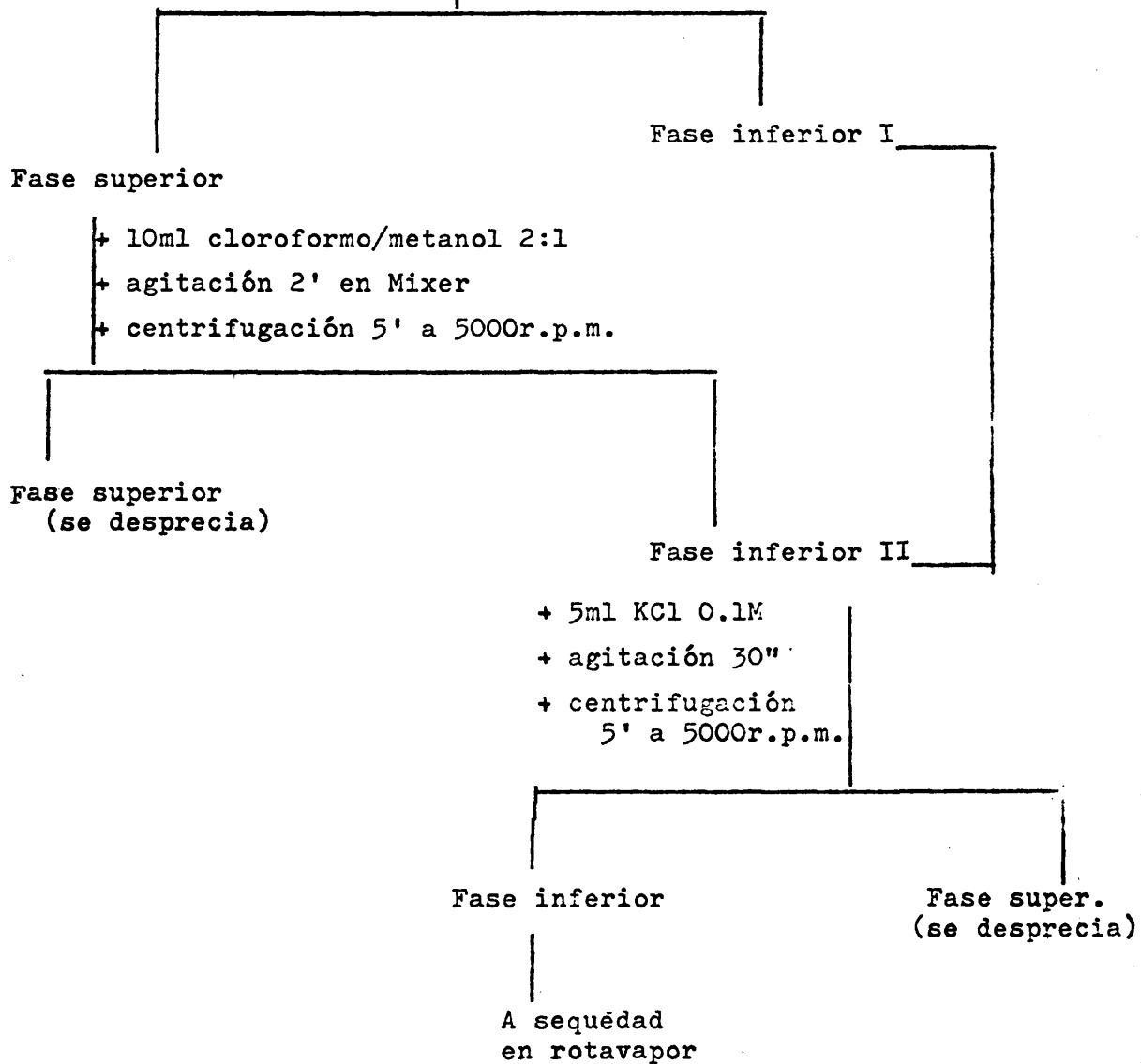
2.3.1 AISLAMIENTO DE LIPIDOS TOTALES.

Todas las tomas de sangre se realizaron de la vena periférica de la oreja, tras un ayuno de 18-20 horas. Para la obtención del suero se centrifuga la sangre a 3.000 r.p.m. tras un reposo de una hora.

El aislamiento de lípidos totales del suero se efectuó según una modificación al método de Folch, (1.951): 2ml. de suero se extraen dos veces con 10ml. de cloroformo/metanol (2:1), los extractos clorofórmicos reunidos se lavan con 5 ml. de KCl 0,1M y la fase clorofórmica se extrae mediante centrifugación, evaporándose a sequedad, a continuación, en un evaporador rotatorio a 15-20 mmHg de presión a una temperatura no superior a 40°C. :

SUERO (2ml)

- + 10ml cloroformo/metanol 2:1
- + agitación 2' en Mixer
- + centrifugación 5' a 5000r.p.m.



2.3.2 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

Para la separación de los lípidos polares de los neutros, así como para separar las diferentes clases de los últimos, se ha utilizado cromatografía en capa fina monodimensional, y bidimensional para la obtención de las diferentes clases de fosfolípidos.

Las placas que se utilizan para la realización de las cromatografías son de vidrio, de dimensiones de 20 x 20 cm. y la extensión del soporte se realiza con un extendedor Shandon. El adsorbente utilizado es Silicagel G (E. Merck Darmstadt. Alemania), con un espesor variable según el tipo de cromatografía (600 μ para monodimensional y 300 μ para bidimensional).

La suspensión de Silicagel G se preparó en cada caso inmediatamente antes de la extensión sobre las placas, y de acuerdo con las siguientes proporciones:

30 gramos de Silicagel G/60 ml H₂O destilada; espesor 300 μ
 45 gramos de Silicagel G/85 ml H₂O destilada; espesor 600 μ
 en ambos casos para obtener 5 placas de las dimensiones mencionadas, que se dejan secar unos 20 minutos a temperatura ambiente, a continuación se introducen una hora en estufa a 110-120° C., después de lo cual se dejan enfriar a temperatura ambiente, para proceder a su utilización.

Los sistemas empleados para el desarrollo de las cromatografías son los siguientes:

Lípidos neutros

n-Hexano/éter/acético (70:30:1, V/V/V)

Lípidos polares

I) Cloroformo/metanol/amoníaco 7M (90:54:11, V/V/V)

II) Cloroformo/metanol/acético/agua (90:40:12:2, V/V/V/V)

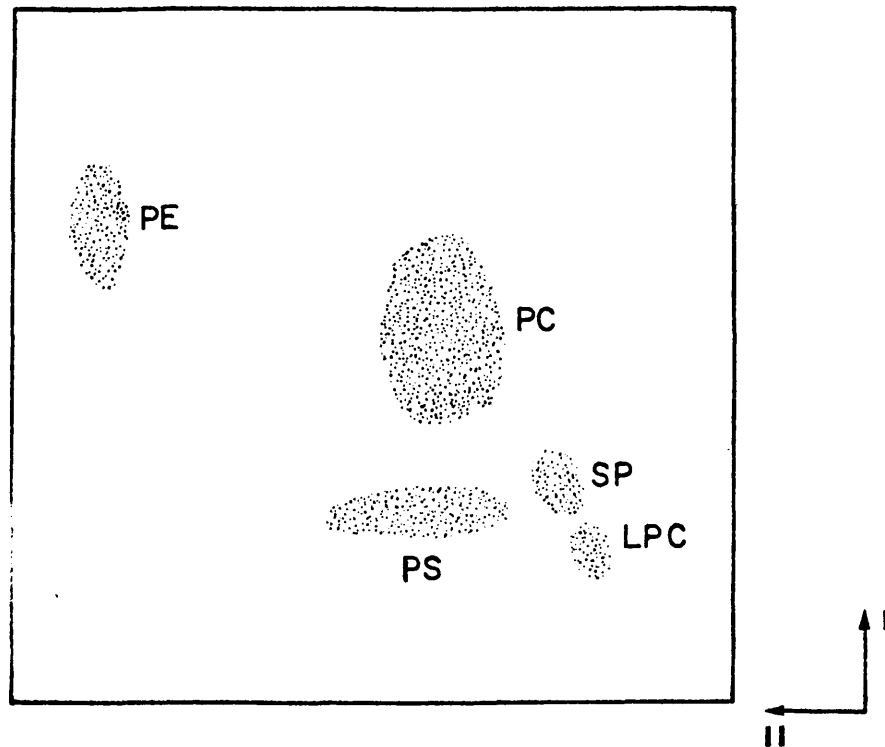
En ambos casos, una vez desarrolladas las cromatografías, se dejan las placas a temperatura ambiente con el fin de que se

evapore todo resto de disolvente; los lípidos se visualizan introduciendo las placas cromatografiadas en una cubeta saturada de vapores de iodo (Mangold et al., 1.961, Sims et al., 1.962). En poco tiempo el iodo se absorbe selectivamente sobre las regiones donde se han quedado situadas las diferentes clases de lípidos, originándose manchas amarillas perfectamente visibles sobre el fondo blanco de la placa. Cada banda se identifica comparando su recorrido con el de los patrones. Después de enmarcar, con un punzón, cada banda, se hace sublimar el iodo, dejándola placa al aire o bien calentando ligeramente en estufa. Eliminado completamente el iodo, se raspan cuidadosamente las manchas correspondientes a los lípidos cuya cantidad interesa analizar, procediéndose a la realización de los diferentes métodos de análisis.

2.3.3 ANALISIS CUANTITATIVO DE FOSFOLIPIDOS

2.3.3.1 ANALISIS DE CLASES DE FOSFOLIPIDOS.

Los lípidos correspondientes a 1 ml. de suero, extraídos de acuerdo con lo descrito en el apartado 2.3.1, se aplican en un punto, sobre placas de Silicagel G de 300 μ previamente lavadas mediante desarrollo de las mismas en un sistema de composición: metanol/cloroformo/fórmico (2:1:1, V/V/V) y secadas a temperatura ambiente durante 12 horas, con el fin de evitar fondos oscuros sobre la placa que impida la buena visualización de los fosfolípidos. Las placas se desarrollan en los sistemas (I y II), mencionados en el apartado anterior para lípidos polares, una vez realizada la cromatografía y evaporado el resto de disolvente, los fosfolípidos se visualizan por introducción de las placas en una cubeta de iodo y se delimitan las manchas correspondientes a : liso fosfatidilcolinas (LPC), esfingomielinas (SP), fosfatidilcolinas (PC), fosfatidiletanolaminas (PE) y fosfatidilserinas (PS):



Una vez sublimado el iodo se raspan las manchas correspondientes con una espátula y se transfieren a unos matraces Kjeldhal. El conjunto de los matraces es sometido luego a las siguientes operaciones (Rouser et al., 1.966):

Se adicionan 0,9 ml. de ácido perclórico al 70%, a cada uno de los matraces y se introducen en un baño de arena, durante 25 minutos, a 250-260°C, con el fin de mineralizar el fósforo orgánico.

Una vez transcurrido el tiempo se retiran los matraces y se dejan enfriar a temperatura ambiente.

A cada matraz se le adicionan agua destilada y reactivos, de acuerdo con el siguiente orden:

- 1) 7 ml. de agua destilada
- 2) 1 ml. de solución de molibdato amónico al 25% (P/V)
- 3) 1 ml. de solución de ácido ascórbico al 10% (P/V)

A continuación los matraces se calientan en un baño de agua hirviendo, durante 7 minutos, al cabo de los cuales se detiene la reacción por inmersión de los matraces en un baño de hielo. Seguidamente se elimina el ácido silícico de cada muestra por centrifugación del contenido de cada matraz, a 3.000 r.p.m., durante 5 minutos. Por último se leen las densidades ópticas a 820 mμ en un fotolorímetro equipado con filtro rojo.

Las cantidades de cada fosfolípido se obtuvieron contrastando las densidades ópticas frente a una curva patrón, construida con una solución de fosfato inorgánico de concentración exactamente conocida y de acuerdo con la metodología descrita, eliminando el paso previo de mineralización del fósforo.

En ambos casos se leen las densidades ópticas frente a un blanco que contiene:

- 0,9 ml. de ácido perclórico.
- 7 ml. de H₂O destilada
- 1 ml de solución de molibdato amónico al 2,5%
- 1 ml de solución de ácido ascórbico al 10%

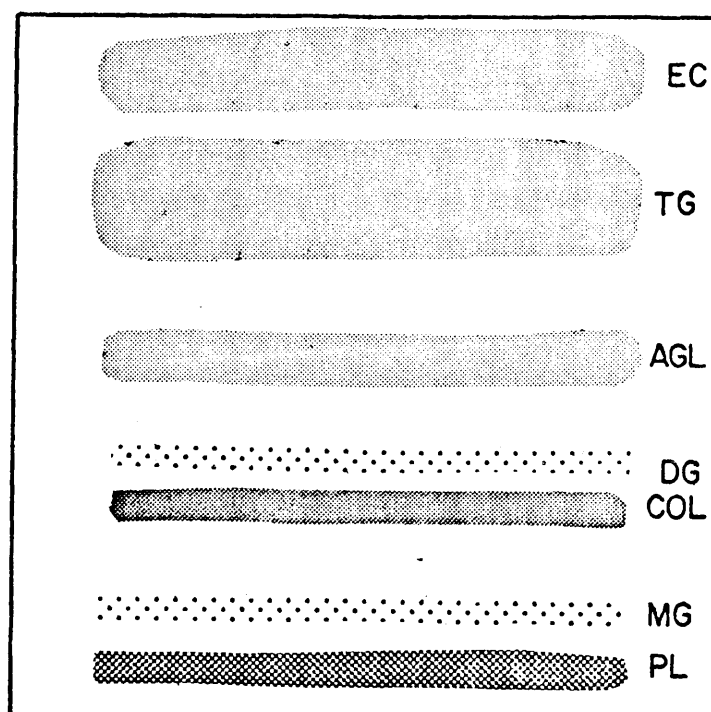
Sometido durante 7 minutos a 100°C en un baño de agua hirviendo.

Este método es sensible entre 1 y 8 μg. de fósforo por muestra. Para cantidades superiores a estas se debe proceder a una dilución una vez desarrollado el color, contrastando las densidades ópticas frente a una curva patrón realizada con idéntica dilución.

2.3.3.2 ANALISIS DE FOSFOLIPIDOS TOTALES

Los lípidos totales correspondientes a uno o dos ml. de suero se aplican en banda continua (de unos 5 cm.), sobre placas de Silicagel G, de 600µ de espesor que se desarrollan en el sistema de disolventes correspondiente a lípidos neutros (separado 2.3.2). Una vez realizada la cromatografía y eliminado el disolvente, las placas se someten a vapores de yodo.

Según este tipo de cromatografía, el conjunto de los fosfolípidos permanecen en el origen (PL) separándose, por el contrario, las restantes especies lipídicas menos polares. De esta forma se obtienen, perfectamente diferenciados, los glicéridos (MG), colesterol (COL), diglicéridos (DG), ácidos grasos libres (AGL), triglicéridos (TG) y esteres de colesterol (EC) de acuerdo con su polaridad:



La mancha correspondiente a los fosfolípidos totales se raspa cuidadosamente, una vez sublimado el yodo, y se transfiere a un matraz Kjeldhal y se procede a su valoración de acuerdo con lo descrito en el apartado 2.3.3.1.

2.3.4 ANALISIS CUANTITATIVO DE TRIGLICERIDOS

De la misma placa de cromatografía que la utilizada para la obtención de los fosfolípidos totales (2.3.3.2), la zona correspondiente a los triglicéridos se raspa y transfiere a un tubo de vidrio (boca esmerilada, B-19) con el fin de extraer los triglicéridos adsorbidos sobre la Silicagel G. El proceso de extracción transcurre de acuerdo con los pasos siguientes:

- 1º) triglicéridos adsorbidos sobre Silicagel + 10 ml. de cloroformo
agitación 2 minutos en un mixer
centrifugación 6 minutos a 7.000 r.p.m.
extracción de la fase clorofórmica
- 2º) residuo de Silicagel + 10 ml. de cloroformo
agitación 2 minutos
centrifugación 6 minutos a 7.000 r.p.m.
extracción de la fase clorofórmica
- 3º) reunión de las dos fases clorofórmicas
evaporación a sequedad en un evaporador rotatorio,
a baja presión.

El residuo seco de triglicéridos se evapora de acuerdo con el método de Skidmore (1.962), basado en la transformación de los esterres en ácidos hidroxámicos, que forman con el ión férrico (Fe^{3+}) un complejo coloreado, que se determina colorimétricamente mediante lectura de las densidades ópticas a 530 mμ en un fotocolorímetro. las cantidades de triglicéridos se obtienen contrastando las densidades ópticas frente a una curva patrón construida con una solución clorofórmica de un triglicérido (tripalmitina, tri-

miristina) de concentración perfectamente conocida.

2.3.5 ANALISIS CUANTITATIVO DE ACIDOS GRASOS LIBRES

La valoración de ácidos grasos libres se realiza por determinación directa sobre el suero, de acuerdo con el método de Dole et al., (1.960), modificado por Ko y Royer (1.967): un volumen conocido de suero (0,5-1 ml.) se extrae con una mezcla de extracción formada por alcohol isopropílico/n-heptano/H₂SO₄ 1N (40:10:1, V/V/V). La fase orgánica que contiene los ácidos grasos libres se extrae después de agitación y centrifugación y se titula con hidróxido de tetrabutylamonio 0,001N, utilizando como indicador una disolución de timolftaleína 0,01% en acetona y gaseando continuamente con nitrógeno, con el fin de evitar la disolución en el medio del CO₂ ambiental, que conduciría a una determinación errónea.

2.3.6 ANALISIS CUANTITATIVO DE COLESTEROL TOTAL

La mezcla de colesterol libre y esterificado se valora, también, directamente del suero según el método de Zak et al., (1954) y Henly (1957): a 0,1 ml. de suero, se añaden 10 ml. de una solución de FeCl₃ en ácido acético (0,05% P/V) la mezcla se agita y se deja reposar 15 minutos, con el fin de conseguir que la floculación de las proteínas séricas sea completa, una vez transcurrido este tiempo se centrifuga 5 minutos a 5.000 r.p.m., a continuación se toman 5 ml. del sobrenadante, a los que se añaden 3 ml. de ácido sulfúrico concentrado, dejando la mezcla en reposo después de una ligera agitación, durante 30 minutos a partir de los cuales el color desarrollado es estable, momento en que se miden las densidades ópticas a 560 mμ en un fotocolorímetro, frente a un blanco en el que se ha sustituido el suero por 0,1 ml. de NaCl al 0,9% (P/V). Las densidades ópticas obtenidas se contrastan frente a una curva patrón, en cuya construcción se ha utilizado

una solución de colesterol en ácido acético.

Es interesante hacer notar la importancia que tiene una agitación inmediata a la adición de los 3 ml de ácido sulfúrico concentrado, con el fin de obtener resultados correctos.

2.3.7 ANALISIS DE LIPOPROTEINAS.

La separación de lipoproteínas séricas se lleva a cabo por electroforesis en gel de poliacrilamida, utilizando una modificación al método de Pratt, et al., (1.969): se preparan disoluciones discontinuas de poliacrilamida que contienen, respectivamente, el 2% (1 cm. de altura), 2,5% (0,5 cm. de altura), 3,0% (0,5 cm. de altura) y 6,5% (5 cm. de altura), de acrilamida. Se utiliza como colorante Sudan black B (colorante para lípidos, que tiñe, específicamente, la parte lipídica de las lipoproteínas) de acuerdo con el método propuesto por Mc. Donald, et al. (1.959). A continuación se procede al densitometrado de los geles en un densitómetro Canalco, equipado con un integrador automático.

2.4 EXTRACCION DE LIPIDOS TOTALES DE TEJIDOS.

Todos los animales se sacrifican el día correspondiente al día 29 de gestación de los gestantes, mediante una inyección de aire en la vena periférica de la oreja, la muerte se produce inmediatamente, en pocos segundos. Los órganos maternos (pulmón, hígado, y tejido adiposo) son extraídos inmediatamente, lavados en una disolución de NaCl al 0,85% fría, e introducidos en aire líquido hasta su utilización posterior. En el caso de los animales gestantes, los fetos son obtenidos por cesarea y sacrificados simultáneamente por decapitación, los órganos fetales (pulmón e hígado) son extraídos rápidamente, lavados con NaCl 0,85% frío, e igualmente, introducidos en aire líquido.

Para la extracción de los lípidos totales, los tejidos

congelados son expuestos a temperatura ambiente, hasta que se obtiene la consistencia normal. Posteriormente, los tejidos, debidamente troceados se homogeneizan en un Omni-Mixer (Sorvall), con cloroformo/metanol (2:1, V/V) (20 ml de cloroformo/metanol/gr. de tejido), de acuerdo con el método de Folch, (1.951). La suspensión clorofórmica se lava con una solución de KCl 0,1M (0,25 ml/ml suspensión clorofórmica), se agita y se centrifuga 5 minutos a 5.000 r.p.m., la fase inferior clorofórmica se extrae y deja secar sobre Na_2SO_4 anhidro, durante unas horas, una vez seca se separa del Na_2SO_4 por filtración y se evapora a sequedad en un evaporador rotatorio a baja presión.

Durante todo el proceso de extracción, la fase clorofórmica se gasea constantemente con N_2 a fin de evitar la posible oxidación de los lípidos. En algunas ocasiones se utilizó un antioxidante, BHT, que es añadido al comienzo de la extracción, si bien no es muy aconsejable su utilización por producir interferencias en el análisis posterior de los lípidos por cromatografía de gases, si no se toman las correspondientes medidas de purificación.

2.4.1 SEPARACION CROMATOGRAFICA DE LOS LIPIDOS TOTALES DE TEJIDOS.

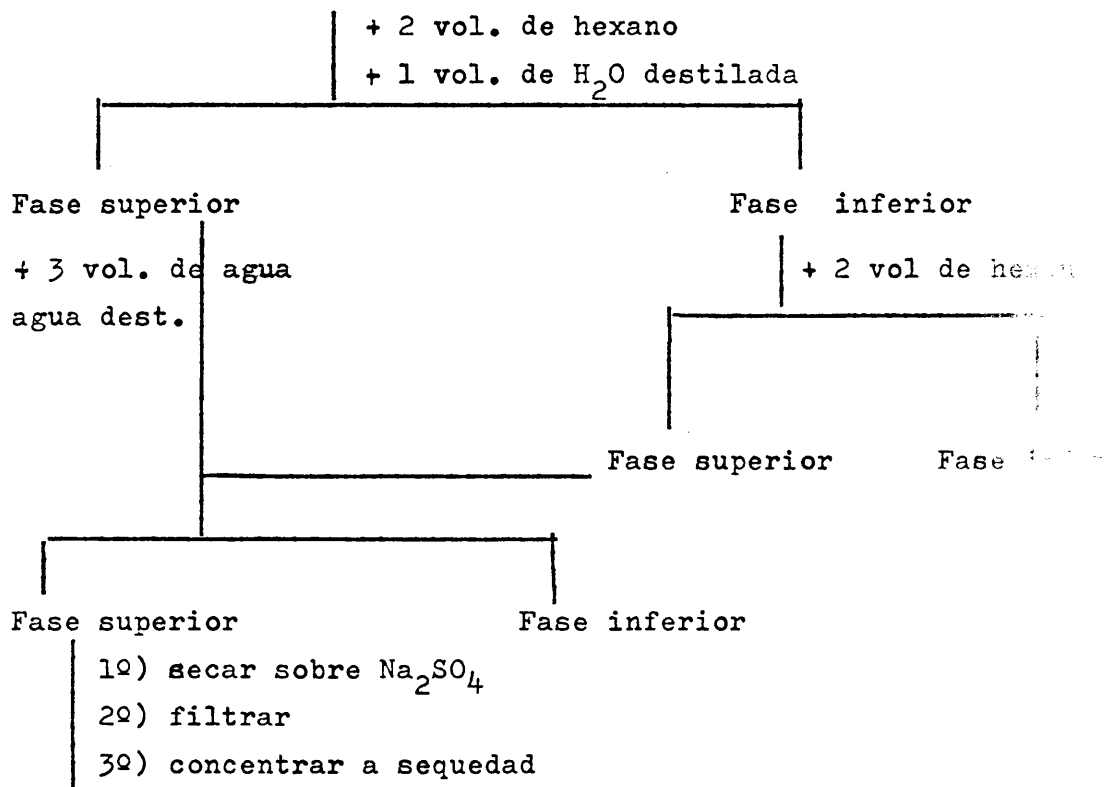
La separación de las diferentes clases lipídicas se lleva a cabo por cromatografía en capa fina, sobre placas de Silicagel G (20 x 20 cm.), de 600 μ de espesor, el residuo seco de lípidos totales se disuelve en cloroformo/metanol (2:1, V/V) y se aplican sobre las placas en banda continua (16 cm.; 20 mg. de lípidos totales) y se desarrollan en n-hexano/éter/acético (70:30:1, V/V/V). Las bandas correspondientes a triglicéridos y fosfolípidos se detectan pulverizando las placas, una vez secas de disolvente, con Rodamina 6G (0,1% en metanol) (Mangold et al., 1.961) los lípidos aparecen como manchas rosas sobre fondo naranja. Bajo la luz ultravioleta se destaca más el contraste entre la mancha y el fondo; no destruye los lípidos y por esta razón

es el revelador utilizado siempre que se proceda a un análisis de ácidos grasos.

2.5 ANALISIS DE ACIDOS GRASOS TOTALES Y DE TRIGLICERIDOS Y FOSFOLIPIDOS DE TEJIDOS. OBTENCION DE ESTERES METILICOS Y ANALISIS.

Un extracto de lípidos totales, así como las bandas correspondientes a triglicéridos y fosfolípidos que se rasparon, se metanolizaron de acuerdo con el método de Metcalfe y col. (1961): los lípidos se sitúan en tubos de vidrio (ya sean puros o adsorbidos sobre Silicagel), de paredes gruesas de 20 x 150 mm. y se agregan: 1 ml. de metanol reactivo (C. Erba), 1 ml. de trifluoruro de boro-metanol al 14% y 0,9 ml. de benceno, por cada 10 mg. de lípidos. Los tubos se cierran con soplete, bajo atmósfera de nitrógeno y la mezcla se mantiene a 110°C, durante una hora y 30 minutos. Transcurrido este tiempo, los tubos se enfrian a temperatura ambiente y se abren. La extracción de esteres metílicos se realiza de acuerdo con el siguiente esquema:

Solución de esteres metílicos (1 vol.)



Residuo seco de esteres metílicos.

De esta forma se obtienen los esteres metílicos de los ácidos grasos del conjunto de los lípidos totales o de cualquier fracción lipídica.

Las muestras de esteres metílicos se purifican por cromatografía en capa fina (es absolutamente necesaria la purificación cuando se ha utilizado BHT como antioxidante en la extracción de lípidos), sobre placas de Silicagel G, 20 x 10 cm. y 500 μ de espesor que se desarrollan en el sistema n-hexano-éter (98,5:1,5 V/V). Las bandas se localizan por pulverización de las placas con Rodamina 6G al 0,1% en metanol y examen bajo luz ultravioleta. La banda correspondiente a los esteres metílicos que aparece justo encima del origen, se raspa y transfiere a un tubo y se extrae con n-hexano siguiendo el esquema de extracción de esteres metílicos.

El análisis de los mismos (disueltos en un pequeño volumen de hexano), se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard, modelo 5750, equipado con un detector de ionización de llama y columnas de acero inoxidable, de 6 pies de longitud y 0,25 mm. de diámetro interno rellenas de polisuccinato al 20% sobre Cromosorb (80-100 mesh). Se operó a 180°C, siendo las temperaturas del detector e inyector de 250 y 350°C, respectivamente.

Las áreas de los picos se determinaron con un integrador-impresor Hewlett-Packard, modelo 3370 A.

La identidad de los picos y validez cuantitativa de las concentraciones calculadas para los ácidos grasos, se establecen por comparación con patrones de esteres metílicos de los diferentes ácidos grasos.

Las figuras analíticas dadas en la representación gráfica de los resultados, son el valor medio de tres muestras iguales ($p < 0,01$). El grado de insaturación se calcula como (% de monoinsaturados/100) + 2 (% de diinsaturados/100) + 3 (% de triinsaturados/100) + 4 (% de tetrainsaturados/100).

2.6 HIDROLISIS ENZIMATICA DE FOSFOLIPIDOS PARA ESTUDIAR LA DISTRIBUCION POSICIONAL DE ACIDOS GRASOS.

Con el fin de estudiar la distribución posicional de ácidos grasos en fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas de tejidos, fueron aisladas de los lípidos totales por cromatografía en capa fina, sobre placas de 20 x 40 cm. y 1 mm. de espesor (90 gr. de Silicagel G/ 160 ml. de agua destilada, para realizar la extensión de dos placas de estas dimensiones). Conviene activar las placas durante una hora a 110°C antes de su utilización.

Sobre cada una de ellas se aplican 100 mg. de lípidos total

les, en forma de banda continua, y se desarrollan en el sistema cloroformo/metanol/agua (65:25:4, V/V/V). Las bandas de lípidos se localizan revelando dos franjas estrechas a ambos lados de la placa con solución Dittmer, que es un revelador específico de fosfolípidos (Dittmer, 1.964).

Se recogen las bandas correspondientes a fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina y se eluyen del ácido silícico con sucesivas proporciones de cloroformo/metanol (2:1, 1:1, 1:9, V/V) y metanol absoluto. Los extractos reunidos se evaporan a sequedad para ser sometidos a hidrólisis con fosfolipasa A₂, que libera específicamente los ácidos grasos de la posición 2 del fosfolípido original.

La hidrólisis se llevó a cabo por el método de Van Golde y col. (1.966): se añade el fosfolípido (10 mg. exentos de ácido silícico) a una mezcla de veneno de *Crotalus Adamanteus* (Sigma) (4 mg.), cloruro cálcico 5 mM (0,4 ml.) y tampón borato 0,1 M pH 7,2 (0,4 ml). El conjunto de la mezcla se agita en una incubadora durante dos horas a 28°C. El curso de la hidrólisis se siguió por cromatografía en capa fina (Silicagel G, 500 μ , 20 x 20 cm.), utilizando cloroformo/metanol/agua (65:25:4, V/V/V) como sistema de desarrollo; la hidrólisis es total a las dos horas y se detiene la reacción adicionando 5 ml. de metanol a la mezcla, después de lo cual se evapora a sequedad en evaporador rotatorio. Los ácidos grasos liberados y lisoderivados de ambos fosfolípidos se disuelven en cloroformo/metanol (1:1, V/V) y se separan en placas de Silicagel G, de 20 x 20 cm. y 500 μ de espesor, que se desarrollan en cloroformo/metanol/agua (65:25:4, V/V/V).

Las bandas de lisoderivados y de ácidos grasos libres (posición 1 y 2, respectivamente) se localizan pulverizando las placas con Rodamina 6G (0,1% en metanol) y examen con luz ultravioleta. Se recogen las bandas correspondientes y se metanolizan y analizan según el método descrito en el apartado 2.5 .

Hay que hacer resaltar que, con el material utilizado por nosotros, las PE de pulmón no se hidrolizan totalmente con veneno de *Crotalus*, al menos en las dos horas de incubación, y por esta razón se utilizaron indistintamente para su hidrólisis, venenos de *Naja-Naja* o de *Naja-Haje* (ambos de Sigma), que conducen a la hidrólisis total del fosfolípido mencionado, a las dos horas de incubación.

2.7 HIDROLISIS DE TRIGLICERIDOS CON LIPASA PANCREATICA PARA ESTUDIAR LA DISTRIBUCION PARCIAL DE ACIDOS GRASOS.

Los lípidos extraídos de acuerdo con lo descrito en el apartado 2.4 se separan por cromatografía en capa fina, sobre placas de Silicagel G de 20 x 40cm. y 1.000μ de espesor. Se aplican sobre la placa 100 mg. de lípidos totales en forma de banda continua y se desarrollan en n-hexano/éter/acético (70:30:1, V/V/V). La banda de triglicéridos se localizó mediante pulverización de las placas con Rodamina 6G (0,1% metanol) y observación bajo luz ultravioleta. La banda correspondiente a dichas especies lipídicas se raspa de la placa y se transfiere a tubos de vidrio (boca esmerilada, B-29), procediéndose a continuación a la elución del ácido silícico, por sucesivas extracciones con cloroformo puro. Las fases clorofórmicas reunidas se evaporan a sequedad.

La hidrólisis de los triglicéridos, que permite estudiar la distribución parcial de ácidos grasos, se llevó a cabo de la siguiente manera: a 10 mg. de triglicéridos puros se añaden 0,25 ml. de solución de CaCl_2 al 22% (p/v); 0,35 ml. de desoxicolato sódico al 0,1% (p/v) y 4,0 ml. de tampón tris 1 M, pH 8,0. Esta mezcla previamente sonicada, se incuba con lipasa pancreática (19 mg. previamente lavados con acetona fría), a 40°C, durante 10 minutos. La reacción se detiene por adición de HCl 6N (0,7 ml), y los productos de hidrólisis se obtienen mediante tres extracciones sucesivas con 20 ml. de éter. Las fases etéreas reunidas

se secan sobre Na_2SO_4 anhidro; a continuación se filtra y evapora a sequedad en evaporador rotatorio.

Los productos de hidrólisis se separan por cromatografía en capa fina, sobre placas de Silicagel G de 500 μ de espesor y de 20 x 20 cm. ; el sistema de disolventes empleado es n-hexano/éter/acético (70:30:1, V/V/V). La detección de los ácidos grasos libres (posiciones 1 + 3) y monoglicéridos (posición 2) se realiza por pulverización de las placas con Rodamina 6G (0,1% en metanol) y observación bajo luz ultravioleta. Las bandas correspondientes a mencionadas posiciones son transferidas a tubos de metanolisis, procediéndose al análisis de los esteres metílicos correspondientes, según la metodología descrita en el apartado 2.5.

2.8 CINETICA DE TRIGLICERIDOS Y FOSFOLIPIDOS.

Se estudia la incorporación de Glicerol-2-³H a triglicéridos y fosfolípidos de suero y tejidos de conejas, en tres grupos de animales sometidos a diferentes tratamientos:

Control total

No gestante con insulina(1U/dia)

Control gestante

El glicerol-2-³H se inyecta por via intravenosa, en la vena periférica de la oveja, tras 16 horas de ayuno; en cada inyección la dosis media fué de 3 μ moles de glic-2-³H, con una actividad de 800×10^6 c.p.m.

Las inyecciones se realizan en dias diferentes de gestación (dias 16, 21, 26, 29 y 30) y del tratamiento con insulina (dias 1, 8 y 14); las administraciones al control total coinciden con las del no gestante tratado con la hormona, y ambas con las de los dias 16, 21 y 26 de gestación del control gestante. Despues de la inyección de glicerol-2-³H se toman muestras de sangre a diferentes tiempos (desde 0,5 horas a 9 después de la inyección) y se estudia la incorporación de radiactividad en triglicéridos y fosfolípidos del suero correspondiente.

El dia 30 de gestación, a la coneja gestante, simultaneamente a la toma de sangre que se realiza a las dos horas de la inyección, se le practica una cesárea y se extrae inmediatamente la sangre de los fetos, por decapitación, con el fin de estudiar la incorporación en el suero fetal y compararla con la materna en el mismo tiempo. Asimismo se extraen los hígados de madre y feto, donde se estudia igualmente la incorporación del isótopo en TG y PL.

2.8.1 EXTRACCION Y FRACCIONAMIENTO DE LIPIDOS.

La extracción de los lípidos de suero se realiza de acuerdo con el método descrito en el apartado 2.3.1, y el fraccionamiento de los mismos; de acuerdo con el apartado 2.3.1. Simultáneamente se realizan determinaciones cuantitativas de TG y PL, con el fin de expresar los resultados como actividades específicas (apartados 2.3.3 y 2.3.4).

La extracción de los lípidos de tejidos se realiza de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 2.4 y su fraccionamiento según el apartado 2.4.1; en este caso se realizan, también determinaciones cuantitativas paralelas por el mismo motivo que el señalado en el parrafo anterior.

El conteaje de la radiactividad incorporada en TG y PL se lleva a cabo raspando con una espátula, las bandas correspondientes, a viales para conteaje por centelleo líquido. El sistema de centelleo utilizado se compone de la mezcla formada por: 10,5 gr. de PPO (2,5 difeniloxazol); 0,45 gr. de POPOP (1,4-bis 2-(5-feniloxazolil)-benceno); 150 gr. de naftaleno; dioxano hasta completar 1500ml. de disolución, y agua hasta completar 1800 ml. Las condiciones de conteaje para máxima eficacia se han fijado en 10,1 a 9,9 de discriminación y A 200 para la atenuación, con un tiempo de conteaje de 10 minutos por muestra. La eficacia del conteaje se mantiene en un 24% (Unilux II Nuclear Chicago). Todos los resultados se expresan como:

"incorporación específica" = c.p.m./mg de lípido

Y cada resultado es el valor medio obtenido de 4 animales con idéntico tratamiento.

2.9 BIOSINTESIS DE LÍPIDOS A PARTIR DE VARIOS SUSTRATOS RADIATIVOS.

Estos estudios se realizan sobre cuatro series de animales, simultáneamente. Un grupo de cuatro animales fué usado como control total; un segundo grupo también de cuatro animales fué tratado diariamente con insulina (1,06 U, inyectadas subcutáneamente) durante 22 días. Un tercer grupo de cuatro animales se utilizó para el estudio de la influencia de la gestación (controles gestantes). Por último, un cuarto grupo de cuatro animales, formado por conejas gestantes, recibieron durante 22 días una dosis diaria de 1,06U de insulina.

Todos los animales se sacrifican el día correspondiente al 29 de embarazo de los gestantes, de acuerdo con lo descrito en el apartado 2.4; inmediatamente después se extraen los hígados, que son lavados en solución salina al 0,85%. Simultáneamente se extraen los fetos de la placenta, se sacrifican por decapitación y se extraen los hígados que se lavan también con solución salina.

Los experimentos que se detallan a continuación se realizaron con cada uno de los hígados de los adultos y con un "pool" de hígado de los fetos.

2.9.1 PREPARACION DE LOS HOMOGENEIZADOS.

Los hígados adultos y fetales, convenientemente troceados, se homogeneizan con tres volúmenes de tampón-Tris 0,05M, pH=7,4 frío, utilizando un homogeneizador Potter-Elvehjem de vidrio, con un émbolo de teflón. Los homogeneizados se filtran a través de gasa doble y el filtrado obtenido se centrifuga a 900g durante 10 minutos. Los sobrenadantes se utilizan en el estudio de la biosíntesis de ácidos grasos a partir de determinados sustratos. La determinación de las proteínas totales del sobrenadante se realiza de acuerdo con el método de Lowry y col. (1.951), que se describe en el apartado 2.10.

Todas las operaciones se realizan entre 00 y 40 C y en la preparaci3n del homogeneizado se considera que un gr. de tejido= 1 Volumen.

2.9.2 PREPARACION DE LAS INCUBACIONES.

Se realizaron una serie de incubaciones en un volumen de 1 ml. en las cuales los cofactores comunes a todas ellas en μ mol/ml. fueron:

Coenzima A	0,6
ATP	6,0
NADPH	1,0
Cl ₂ Mg	2,0
Citrato s3dico	3,0
Acetato s3dico	2,0
Estreptomicina	1mg

diluidos todos ellos en tamp3n fosfato pot3sico pH = 7,4, en una concentraci3n de 20 mol/ml.

Los sustratos radiactivos usados en cada caso fueron:

Acetato s3dico 1- ¹⁴ C	100 μ Ci
Capr3lico 1- ¹⁴ C (8:0)	3 μ Ci
C3prico 1- ¹⁴ C (10:0)	3 μ Ci
La3rico 1- ¹⁴ C (12:0)	2,5 μ Ci
Mir3stico 1- ¹⁴ C (14:0)	2,5 μ Ci
Palm3tico 1- ¹⁴ C (16:0)	2,5 μ Ci
Este3rico 1- ¹⁴ C (18:0)	2,5 μ Ci
Oleico 1- ¹⁴ C (18:1)	2,5 μ Ci
Linoleico 1- ¹⁴ C (18:2)	2,5 μ Ci

Todos los 3cidos grasos radiactivos utilizados, cuyo rango de actividad espec3fica se encontraba entre 20 y 40 mCi/m mol vienen disueltos en benceno. La cantidad utilizada se micropipetea

al tubo de incubación y se lleva a sequedad con nitrógeno; a continuación se le añaden los cofactores, diluidos en fosfato potásico y el conjunto se sonica durante 15 segundos, tres veces, para resuspender y homogeneizar la distribución del ácido graso en la mezcla de incubación. Se añaden, al final, 0,6 ml. de preparado enzimático respectivo. La incubación se realiza a 37°C durante 120 minutos. La reacción se detiene añadiendo 2,1 ml. de metanol y 1,0 de cloroformo. Los lípidos totales se extraen del medio de incubación según el método de Bligh-Dyer (1.959). El residuo seco se disuelve con 2 ml. de cloroformo.

De los lípidos totales extraídos se cuenta en una alícuota la incorporación total de radiactividad por centelleo líquido, como se detalla mas adelante en el apartado 2.9.4. Otra cantidad proporcional se cromatografía en capa fina sobre placas de 20x20 con Silicagel G, de 400µ de espesor, y de acuerdo con el método descrito en el apartado 2.3.2, para lípidos neutros; por último, otra fracción de los lípidos totales obtenidos de cada incubación se analiza por radiocromatografía de gases (radio CLG) como se describe en el próximo apartado (2.9.3).

En todos los casos se realiza, paralelamente, la determinación cuantitativa de todas las especies lipídicas estudiadas, de acuerdo con los métodos previamente descritos (2.3.3, 2.3.4, 2.3.5). Para la realización de estas determinaciones se realizaron incubaciones con los mismos cofactores, ya detallados, pero sin sustratos radiactivos.

2.9.3 PREPARACION DE LAS MUESTRAS RADIATIVAS PARA RADIO CLG.

Los ácidos grasos libres, o esterificados en lípidos complejos correspondientes a una alícuota de lípidos totales ó a cada una de las fracciones lipídicas obtenidas por cromatografía en capa fina (revelado con Rodamina 6 G, 0,1% en metanol), se metanolizan transformándose en esteres metílicos de acuerdo con lo descrito en el apartado 2.5.

Los esteres metílicos, una vez extraídos y purificados se separan e identifican por cromatografía de gases, en un cromatógrafo Perkin-Elmer, modelo F20FE con detector de ionización de llama, equipado con una columna de acero inoxidable (1,83 m. x 0,31 cm.), rellena con 10% de EGS sobre Chromosorb W (60-80 mallas). Como gas portador se utiliza He, con un flujo de 18,3 ml/min. y la temperatura de la columna se mantiene a 170°C. Las temperaturas del inyector y detector son de 300°C y 200°C respectivamente.

La radiactividad de los esteres metílicos se determina a la salida de la columna cromatográfica por medio del reactor de flujo continuo/contador proporcional Perkin-Elmer, modelo RG-270, conectado a la unidad cromatográfica por medio de un divisor de flujo (relación de caudales 16:1). Las temperaturas de las distintas partes del equipo han sido: contador proporcional, 100°C; horno de reacción, 620°C; tubo de conexión entre el divisor de flujo y el horno, 200°C.

Las señales producidas por el detector de ionización de llama y la del contador proporcional se recogen sobre un mismo registro de doble canal que produce dos gráficas superpuestas la de la cromatografía y la de radiactividad; ambas tienen un desfase de 0,5 min; de esta forma se hace corresponder perfectamente cada ácido graso identificado con su señal de radiactividad. Las actividades específicas se expresan convencionalmente como c.p.m./unidad de área del pico masa.

2.9.4 MEDIDAS DE RADIATIVIDAD POR CENTELLEO LIQUIDO.

La radiactividad total incorporada en los lípidos totales y en cada una de las clases principales se determina por centelleo líquido. Se han utilizado dos sistemas de centelleo: El primero de ellos, utilizado para el conteo de una alícuota de lípidos totales extraídos del medio de incubación, está formado por una mezcla de 4 gr. de PPO; 10 mg. de POPOP, en 1 litro de tolueno.

El segundo sistema, de mayor poder de disolución y que se utiliza siempre que el conteo se realice sobre lípidos adsorbidos en silicagel, se describe en el apartado 2.8.

Las medidas de radiactividad se efectúan en un espectrofotómetro de baja temperatura Unilux II, Nuclear Chicago. Las condiciones del aparato, para máxima eficacia, se han fijado en L-U 0,1 a 9,9 de discriminación y D 800 para la atenuación. El tiempo de conteo ha sido siempre suficiente para obtener un mínimo de 10.000 c.p.m. La eficacia del conteo se mantiene constante, alrededor del 70%.

2.9.5 MEDIDA DE ACTIVIDAD DE ACETIL-CoA LIGASA.

Para medir la actividad de la acetil CoA ligasa, en función de los acetil CoA esteres formados, se realizaron incubaciones que contenían:

100 ml de la mezcla de cofactores indicados en 2.9.2

50 ml del preparado enzimático total

0,25 μ Ci de acetato- 14 C

por tubo, a 37°C, en un baño de agua, provisto de agitación mecánica, durante 15 minutos.

La reacción se detiene con 50 ml de ácido tricloroacético al 40%; a continuación se centrifuga durante 1,5 minutos para sedimentar las proteínas desnaturalizadas. Una alícuota del sobrenadante se aplica sobre papel Whatman nº 1 en un trozo del tamaño del fondo del vial donde se va a medir la radiactividad por centelleo líquido; (se hacen dos aplicaciones idénticas de 25 μ l).

A continuación se somete la aplicación sobre el papel Whatman a un arrastre de vapor, durante 10 minutos, con el fin de eliminar el ácido no esterificado; después se seca el papel en una estufa a 80°C, durante 10 minutos y, por último, se mide la radiac

tividad incorporada por centelleo líquido (el líquido de centelleo utilizado es el de dioxano y naftaleno, cuya composición se especifica en el apartado 2.8).

Todas las determinaciones se realizan por duplicado, midiendo también blancos que contienen los cofactores y el isótopo pero en los que se ha sustituido el preparado enzimático por tampón Tris 0,05M, pH=7,4. Asimismo se cuentan, directamente por centelleo líquido 25 ml del sobrenadante, con el fin de conocer exactamente el total de acético utilizado.

La eficacia del arraste, calculada con patrones, es de un 96,5% y la desviación máxima de las determinaciones dobles es de $\pm 2,5\%$.

2.9.6 DETERMINACION DE NIVELES DE ACIL-CoA ESTERES.

Se ha utilizado una modificación al método de Marcel y Sue (1.972).

En la separación de los lípidos neutros, por cromatografía en capa fina (2.3.2), se ha comprobado que los AGL, y sus formas activas de CoA, corren juntos. Esta identificación se ha realizado mediante análisis elemental (determinación de S por fusión alcalina), y funcional (espectrometría infrarroja; identificación de grupos ester, según el método de Skidmore (1.962), que se menciona en el apartado 2.3.4 e identificación de ácidos grasos libres, de acuerdo con el método de Dole et al. (1.960) y modificado por Ko et al. (1.967), que se describe en 2.3.5).

Una vez separados los AGL y sus formas activas correspondientes, del resto de los lípidos, se separan entre sí por extracción selectiva de los AGL con dietil éter; una vez separados se mide la radiactividad incorporada, en ambos, por centelleo líquido (líquido del centelleo de dioxano-naftaleno, apartado 2.8).

2.10 VALORACION DE PROTEINAS.

En todos los ensayos realizados se lleva a cabo la valoración de proteínas en el preparado enzimático total a fin de calcular actividades enzimáticas específicas y hacer comparables los resultados obtenidos. La valoración de proteínas se realiza por el método de Lowry et al. (1.951), del siguiente modo:

Reactivos

Reactivo Folin-Ciocalteu diluido: 1 vol. de reactivo

Folin-Ciocalteu (Merck) + 2 vol. de agua destilada

Reactivo A: CO_3Na_2 al 2% en NaOH 0,1 N

Reactivo B: $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0,5% en tartrato sódico al 1%

Procedimiento

En el momento de realizar la valoración se prepara una mezcla de los reactivos A y B en la proporción 50 vol. de A + 1 vol. de B; se pone en cada tubo de ensayo 5 ml de esta mezcla y se aña de a cada uno de ellos 1 ml. de la disolución problema, cuyo contenido en proteínas esté comprendido entre 150 y 800 ug/ml. Es necesario, por tanto, efectuar las disoluciones adecuadas del preparado enzimático, de modo que la concentración de proteína se encuentre entre los límites citados. La mezcla después de agitar, se deja a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación se añade a cada tubo 0,5 ml del reactivo Folin diluido. La mezcla se deja 40 minutos a temperatura ambiente con agitación periódica, apareciendo en los tubos una coloración azul cuya absorbancia se mide a 500 m μ frente a un blanco constituido por una mezcla preparada según se ha descrito anteriormente, sustituyendo la disolución problema por 1 ml de agua destilada.

La concentración de proteínas en el problema se deduce a partir de una curva patrón construida con los datos de absorbancia obtenidos con diferentes disoluciones de albúmina de concentración conocida. Esta curva patrón se construye para cada valoración de proteínas. Para la preparación de estas disoluciones patron se ha utilizado en todos los casos albúmina cristalizada de suero de bovino (Signa).

3. RESULTADOS Y DISCUSION.

3.1 EVOLUCION CUANTITATIVA DE DIFERENTES CLASES DE LIPI- DOS DE SUERO DE CONEJO DURANTE LA GESTACION Y LA AD- MINISTRACION DE INSULINA.

En esta experiencia se utilizan cuatro series de conejas con un tratamiento diferente en cada serie. A lo largo de la experiencia se hacen catorce tomas de sangre a cada animal y en cada una de ellas se realizan análisis de ácidos grasos libres, triglicéridos, colesterol total, fosfolípidos totales, clases de fosfolípidos y lipoproteínas. Las cuatro series de conejas estudiadas son conejas control (A), conejas tratadas con insulina (B), conejas gestantes (C) y conejas gestantes tratadas con insulina (D). Las tomas de sangre se realizan cada tres días y las muestras 1, 2 y 3 (figura 7-10) constituyen los correspondientes controles analíticos de cada serie de animales. Las muestras 4, 5 y 6 representan los datos analíticos de los animales que han recibido una dosis diaria de insulina (B y D) de 1,0 unidades, mientras que estas muestras son todavía datos control en la serie de animales A y C. Las muestras 7 a 14 en los animales gestantes (C y D) constituyen los datos analíticos que corresponden a los días 8 a 29 de gestación, siendo análisis control en la serie A y resultados obtenidos en el tratamiento con insulina en la serie B.

La figura 7 muestra los niveles de ácidos grasos libres obtenidos en las cuatro series de animales. Los valores de los animales control (A) son de 30 a 60 μ eq/100 ml, y estos niveles se incrementan notablemente durante la segunda parte de la gestación (C). El tratamiento con insulina provoca un ligero y casi constante descenso (B) que contrarresta la influencia de signo opuesto debido a la gestación entre los días 8 y 17 (D), aunque la clara tendencia a incrementar estos niveles se observa en la última semana de gestación.

En la figura 8 se expresan los niveles de triglicéridos en suero de las cuatro series de animales. Los valores de los

animales control (A) van de 10 a 40 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ y no se modifican por el tratamiento con insulina (B). Los niveles de triglicéridos se elevan bruscamente a partir de los días 14-17 de gestación, tanto en conejas gestantes (C) como en las conejas gestantes tratadas con insulina (D), mostrando en ambos casos un comportamiento muy similar.

En la figura 9 se representan las alteraciones en la concentración de colesterol total en suero en las cuatro series de animales. Los valores de los controles (A) oscilan entre 40-70mg/100 ml y el tratamiento con insulina (B) no parece ejercer un efecto significativo. La gestación provoca un descenso claro y notable tanto en los animales gestantes (C) como en los gestantes que han recibido la dosis diaria de insulina (D).

Los efectos de la gestación (C) o del tratamiento con insulina (B), así como su influencia simultánea (D) sobre la concentración de fosfolípidos totales en suero se expresan en la figura 10. Los animales control (A) poseen concentraciones uniformes de fosfolípidos que se mantienen entre 20-30 $\mu\text{g P/ml}$; estos niveles no se alteran significativamente por la administración de insulina. Sin embargo, la gestación provoca un notable descenso de los fosfolípidos totales hasta valores del orden de 5 $\mu\text{g P/ml}$, incluso en los animales que han sido tratados con insulina (D).

Los fosfolípidos totales se fraccionaron en sus principales clases: fosfatidilcolina y su lisoderivado, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y esfingomielinas, y se determinaron sus niveles coincidiendo con los días 9, 14, 19, 24 y 29 de gestación en las condiciones experimentales C y D. La observación de la figura 11 muestra un descenso claro y general en todas las clases de fosfolípidos durante la segunda mitad de la gestación; esta disminución se hace muy evidente a partir del día 9 de gestación (C y D) y afecta principalmente a los niveles de fosfatidilcolina; los datos analíticos correspondientes a los animales control (A) fueron prácticamente constantes durante el tiempo de la experiencia. La figura 11 muestra también las concentraciones de fosfolípidos en

suero de fetos cuyas madres son gestantes normales (C) o han sido tratadas con insulina (D). Los niveles en suero fetal fueron extraordinariamente diferentes de los de sus madres respectivas, siendo los aspectos mas destacados los elevados niveles de fosfatidilcolinas y esfingomielinas en suero fetal.

La figura 12 muestra la distribución de lipoproteínas de suero en las cuatro series de conejas. En los experimentos C y D, estos análisis fueron realizados coincidiendo con los días 9, 14, 17, 20, 24, y 29 de gestación. Los diagramas A representan las concentraciones relativas de las tres familias de lipoproteínas en los animales control y los diagramas B representan la influencia del tratamiento con insulina sobre dichas concentraciones. Estos diagramas muestran en conejas gestantes un desplazamiento significativo hacia un incremento relativo de las pre- β -lipoproteínas; este incremento fué por término medio de 20-30% en los días 26-29 de gestación (figura 12C) y esta elevación fué acompañada en algunos de estos animales por una clara presencia de quilomicrones. Por otra parte, la administración de insulina durante un tiempo prolongado eleva claramente la relación entre los niveles de lipoproteínas α /pre- β (figura 12B). La distribución de lipoproteínas en los animales gestantes tratados con insulina (D) muestra predominio del efecto de la gestación, sobre todo durante su última semana, mientras que el efecto de la insulina parece predominar durante la primera etapa de la gestación. Las lipoproteínas de suero fetal muestran una composición diferente de la del suero materno, caracterizada sobre todo por una elevada concentración de α -lipoproteínas .

En la bibliografía existente actualmente no están suficientemente explicados los cambios que la gestación provoca en los niveles de algunas de las fracciones de lípidos de suero, ni en lo que respecta al efecto cuantitativo sobre dichos niveles ni a sus causas. De la exposición anterior de los resultados obtenidos se deduce que durante la gestación en conejos se produce un descenso en los niveles de colesterol y fosfolípidos, principalmente fosfatidilcolina, mientras que se elevan los niveles de ácidos grasos

libres y de triglicéridos.

La hiperlipemia que afecta predominantemente a triglicéridos y ácidos grasos libres se observa mas claramente durante la segunda mitad de la gestación; los ácidos grasos libres se elevan de forma regular a lo largo de esta segunda mitad de la gestación, mientras que los triglicéridos muestran un máximo bastante pronunciado entre los días 14 y 26 de gestación, presentando además un pequeño incremento antes del término. Estos incrementos en las concentraciones de ácidos grasos libres y triglicéridos circulantes están asociados con los elevados niveles de pre- β - lipoproteínas y con la presencia de quilomicrones; la distribución de lipoproteínas se caracteriza además por una disminución de las lipoproteínas α y β . Así, se puede asociar el incremento en las pre- β -lipoproteínas en conejas gestantes con un incremento en la liberación de triglicéridos por el hígado, el cual puede tener su origen en una estimulación de la captura y utilización por el hígado de los ácidos grasos libres circulantes o en una estimulación de la propia síntesis de ácidos grasos. Ahora bien, la elevación simultánea de los niveles en plasma de ácidos grasos libres y de triglicéridos sugiere que los ácidos grasos libres del plasma deben ser el factor principal que determina la elevación de los niveles de triglicéridos circulantes. Sin embargo, el diferente comportamiento de los niveles hiperlipemicos de triglicéridos y ácidos grasos libres durante la segunda mitad de la gestación, así como la falta de correlación entre los niveles de triglicéridos y la disminución de los ácidos grasos libres provocada por la administración de insulina durante un periodo de tiempo prolongado, sugieren que en las condiciones citadas esta hipótesis sencilla resulta insuficiente. Parece evidente, por tanto, que en el aumento de la secreción de triglicéridos por el hígado debe estar implicada también la regulación de la síntesis hepática de ácidos grasos.

La distribución cuantitativa de las lipoproteínas de suero de conejas gestantes se caracteriza también por una disminución significativa de los niveles de β -lipoproteínas que es concomitante con el descenso en las concentraciones de fosfolípidos y co

lesterol hasta valores muy bajos durante la última semana de ges
tación. Por otra parte, el desplazamiento hacia el predominio de
 α -lipoproteínas observado en el plasma fetal en relación con el
materno está de acuerdo con los mayores niveles de fosfolípidos,
fundamentalmente fosfatidilcolina, presentes en el plasma de fe-
to a término. Sin embargo, como ya se ha indicado en la primera
parte de esta memoria, la mayor parte de los experimentos "in vi
vo" sugieren que para su síntesis de lípidos el feto depende de
múltiples precursores maternos que, o bien atraviesan directamen-
te la placenta-colesterol, ácidos grasos libres, etc.- o bien son
transformados en la placenta- fosfolípidos. Así, esta transferen
cia de lípidos maternos a los fetos puede ser responsable del des-
censo de ciertos lípidos de plasma que tiene lugar durante la ges
tación en conejos. A este respecto es interesante citar que Zil-
versmit et al. (1.972), utilizando un detergente que bloquea la
hidrólisis de los triglicéridos del plasma, han encontrado que la
velocidad de secreción de colesterol al plasma en conejos gestan-
tes era mayor que la observada en animales no gestantes. Ya que
las β -lipoproteínas disminuyen fuertemente durante la gestación,
una mayor utilización de colesterol y fosfolípidos por los teji-
dos extrahepáticos puede ser una de las causas que contribuyen a
explicar los resultados obtenidos.

Para estudiar el posible papel de la insulina en la regula-
ción de los triglicéridos circulantes así como los posibles efec-
tos de una hiperinsulinemia en conejas gestantes y no gestantes,
se ha llevado a cabo un estudio mediante la administración de in-
sulina durante un periodo prolongado de tiempo a ambos tipos de
animales. Se sabe actualmente que durante el desarrollo los órga-
nos endocrinos del feto controlan su metabolismo lipídico y aunque
los órganos endocrinos fetales producen hormonas de modo similar
al adulto, su regulación en el útero, puede ser muy diferente a la
observada después del nacimiento. Por otra parte, la síntesis de
lípidos es dependiente de la disponibilidad de glucosa y ácidos
grasos en los tejidos, lo que da idea sobre la importancia de es-
te estudio acerca del papel de la insulina.

La administración de insulina "in vivo" durante un periodo prolongado de tiempo no produce ningún cambio significativo en los niveles de triglicéridos, colesterol y fosfolípidos en conejas normales no gestantes; sin embargo, se observa un ligero descenso en la concentración de ácidos grasos libres. Cuando se administra insulina a conejas gestantes, el descenso en los niveles de ácidos grasos que se observa inicialmente, se ve luego contrarrestado y superado por el efecto incrementador que sobre dichos niveles ejerce la gestación. La ausencia de una acción estimulante neta de la insulina sobre la lipogénesis hepática sugiere que su acción sobre los niveles de ácidos grasos libres del plasma se debe a su efecto antilipolítico sobre el tejido adiposo.

Como consecuencia de esta acción periférica de la insulina, la síntesis hepática de triglicéridos utilizará las reducidas cantidades de precursores que llegan al hígado procedentes del plasma. Este proceso conduciría a un descenso en la formación de triglicéridos sino es compensado por un incremento en la lipogénesis hepática a partir de fuentes endógenas. Esta síntesis de triglicéridos a partir de precursores hepáticos endógenos puede superar cuantitativamente al flujo a partir de ácidos grasos libres del plasma, tal como ocurre en rata (Baker y Schotz, 1.76; Nikkilä, 1.976). Teniendo en cuenta los niveles de triglicéridos, este parece ser también el caso en conejos en condiciones de hiperinsulinemia. En cualquier caso, el ligero descenso de las pre- β -lipoproteínas que aparece durante la inyección de insulina parece indicar un posible descenso en la formación hepática de triglicéridos a partir de precursores exógenos. Finalmente, la administración de insulina a las conejas gestantes ni se opone ni elimina los elevados niveles de pre- β -lipoproteínas provocados por la gestación.

$\mu\text{eq}/100\text{ ml suero}$

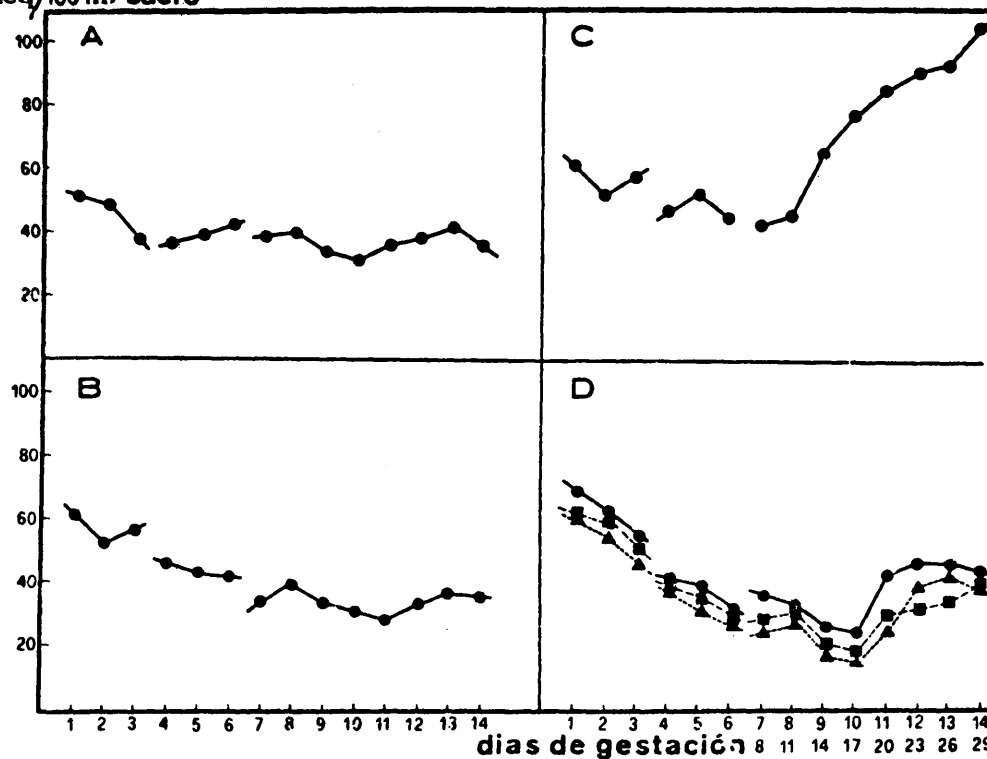


Fig. 7. Concentraciones de ácidos grasos libres en suero. A Animales control. B Animales tratados con insulina. C Animales gestantes. D Animales gestantes tratados con insulina. Cada línea representa el valor medio de un grupo de 4 animales.

$\mu\text{mol}/100\text{ ml suero}$

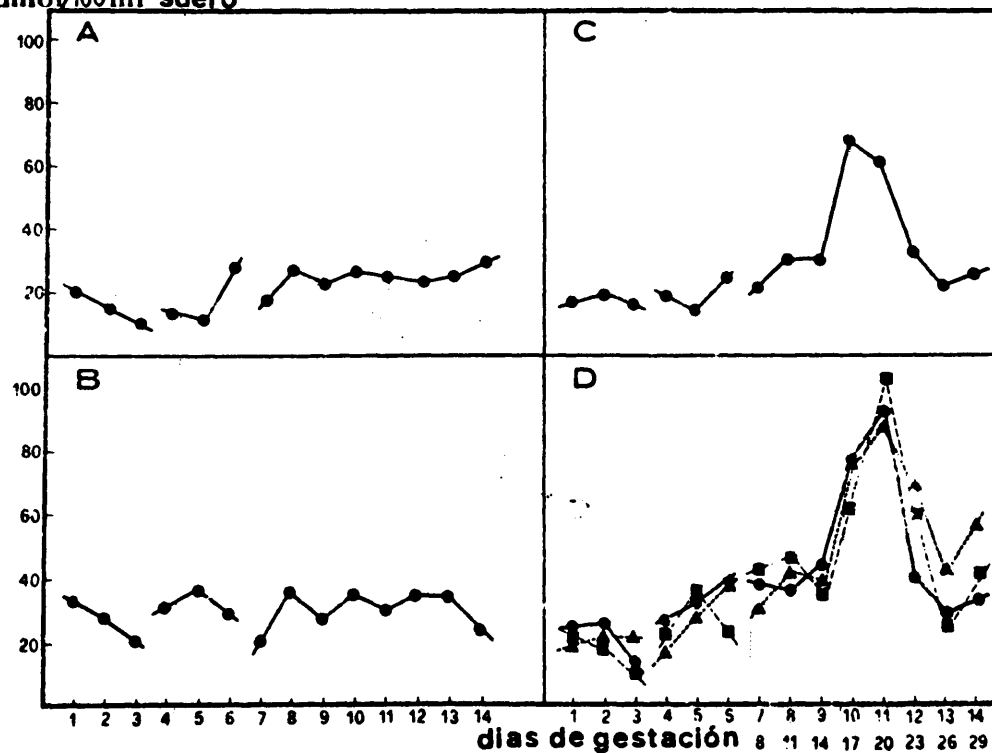


Fig. 8. Concentraciones de triglicéridos en suero. Explicaciones como en la figura 7.

mg/100ml suero

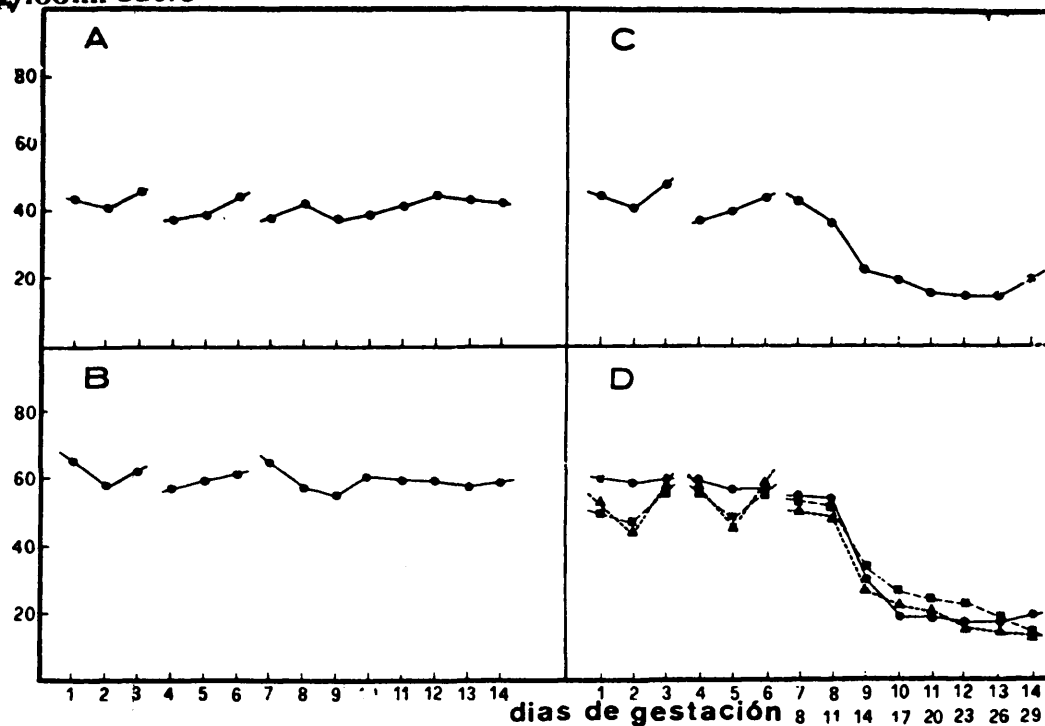


Fig. 9. Concentraciones de colesterol en suero. Explicaciones como en la figura 7.

µgP/ml suero

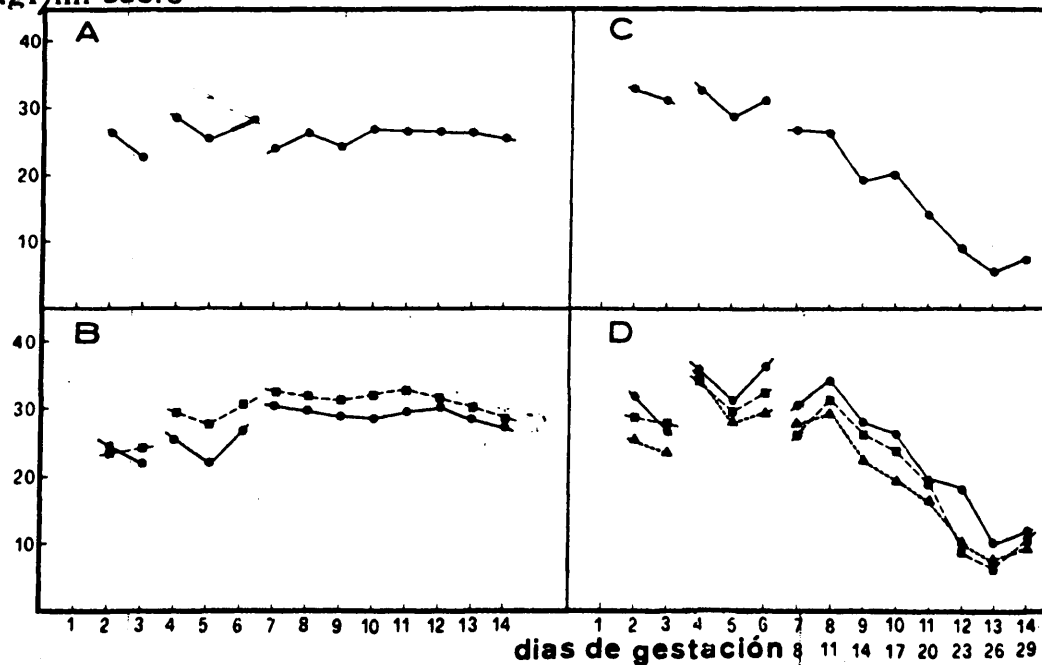


Fig. 10. Concentraciones de fosfolípidos totales en suero. Explicaciones como en la figura 7.

$\mu\text{mol}/100\text{ml suero}$

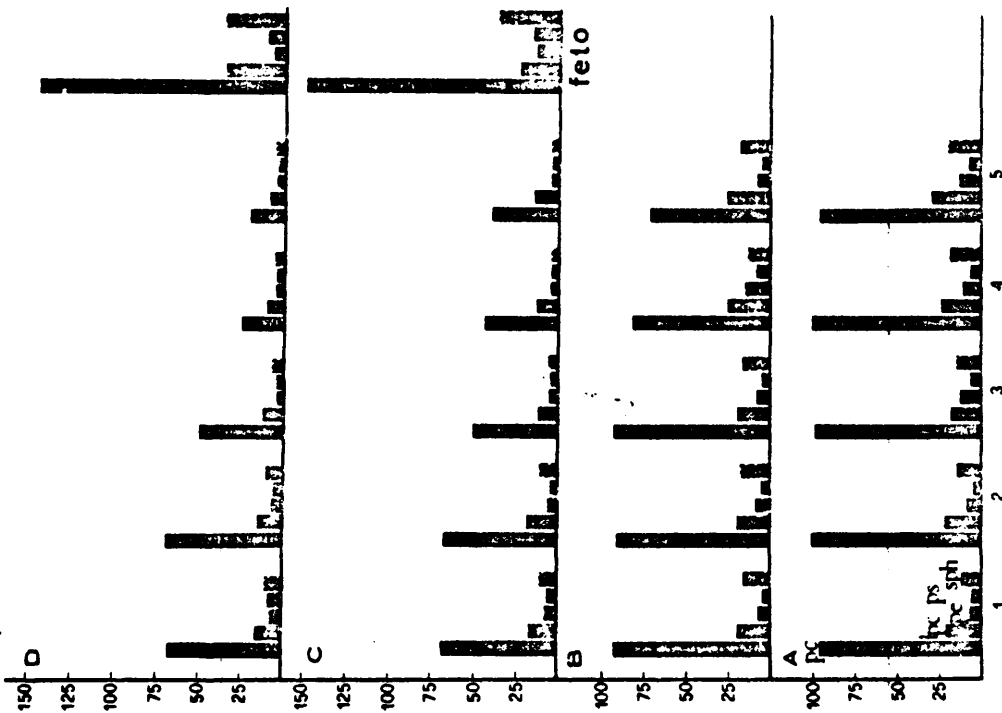


Fig. 11. Concentraciones de clases de fosfolípidos en suero. Explicaciones generales como en la figura 7. En las series A y B las muestras 1-5 corresponden a las tomas de sangre 8, 9, 11, 13, 14; en las series C y D las muestras 1-5 corresponden a los días de gestación 11, 14, 20, 26 y 29.

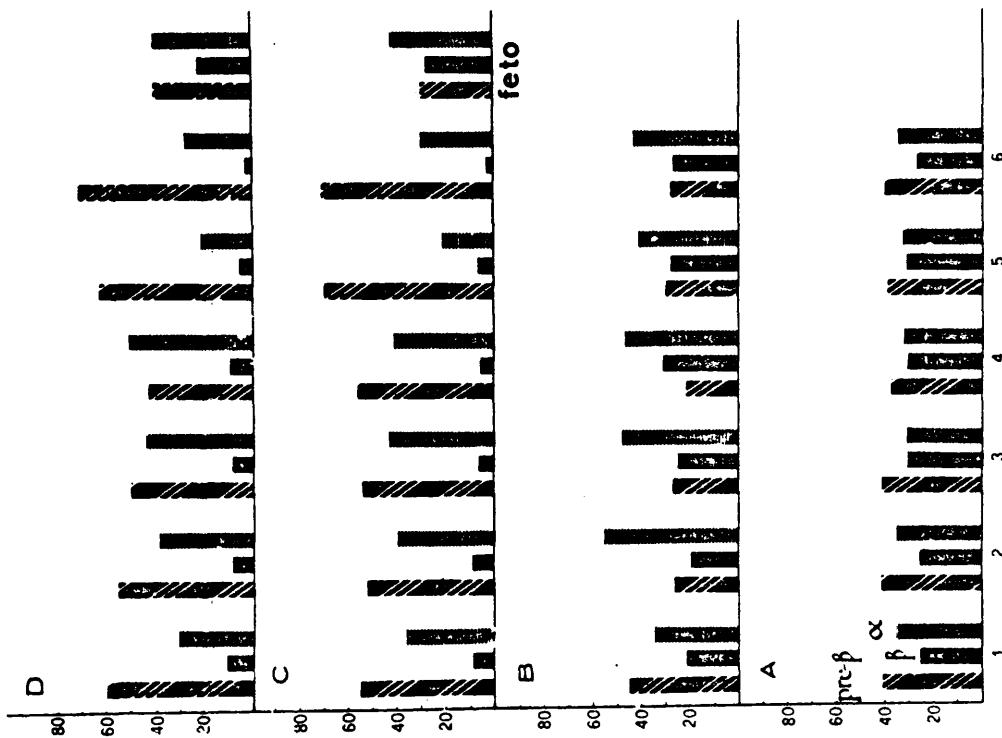


Fig. 12. Concentraciones relativas de lipoproteínas en suero. Explicaciones generales como en la figura 7. En las series A y B las muestras 1-6 corresponden a las tomas de sangre 8, 9, 10, 11, 13 y 14; en las series C y D las muestras 1-6 corresponden a los días de gestación 11, 14, 17, 20, 26 y 29.

3.2 COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE LIPIDOS TOTALES, TRIGLICERIDOS Y FOSFOLIPIDOS DE HIGADO DE CONEJOS. VARIACIONES CUANTITATIVAS PRODUCIDAS POR LA GESTACION, Y LA ADMINISTRACION DE INSULINA.

En la figura 13 se expresa la composición de ácidos grasos de lípidos totales de hígado de conejas normales (13 A) y de hígado de animales gestantes (13 C), de conejas tratadas con insulina (13 B) y de animales gestantes tratados con insulina (13 D). Se observa claramente que la gestación modifica la composición normal de ácidos grasos de lípidos totales de hígado, siendo los cambios mas notables el incremento de ácido palmítico y el descenso de los ácidos estearico y linoleico. La administración prolongada de insulina no provoca alteraciones en la composición de ácidos grasos totales, tanto en animales normales como en animales gestantes.

Los lípidos totales de hígado de los animales control se fraccionan en triglicéridos y fosfolípidos y se estudió la composición de ácidos grasos en ambas clases de lípidos. También se fraccionaron del mismo modo los lípidos totales de hígado procedentes de los animales gestantes y de los tratados con insulina.

En la figura 14 se muestra la composición de ácidos grasos de triglicéridos. La característica principal de los triglicéridos de hígado de los animales control (14 A) son los bajos niveles de ácido esteárico, mientras que los fosfolípidos correspondientes muestran elevados niveles de ácido linoleico. Los triglicéridos de hígado de coneja gestante (14 C) presentan niveles inferiores de ácido esteárico y superiores de ácido palmítico con respecto a los de los animales control. Parece por tanto que estos cambios en la composición de ácidos grasos saturados de los triglicéridos de hígado de los animales gestantes son responsables de las variaciones de su concentración provocadas por la gestación en ácidos grasos totales.

La observación de la figura 15 muestra claramente que los fosfolípidos de hígado de conejas gestantes (15 C) presentan una composición de ácidos grasos caracterizada por bajos niveles de ácidos linoléico. Así pues, parece claro que triglicéridos y fosfolípidos son responsables de los cambios en la composición de ácidos grasos de los lípidos totales de hígado provocados por la gestación; los triglicéridos son responsables de los cambios en la concentración relativa de los ácidos grasos saturados 16:0 y 18:0, mientras que la disminución de ácido linoleico es debida a los fosfolípidos.

Todos estos cambios en la composición de ácidos grasos se reflejan claramente en los valores del grado de insaturación (tabla I). En primer lugar, resulta obvio que de cada grupo de animales los ácidos grasos de los triglicéridos son mas saturados que los de los fosfolípidos. En segundo lugar, la gestación induce una variación en el grado de insaturación de los lípidos totales, incrementando la proporción de los ácidos más saturados. Esta disminución del grado de insaturación es debida a la contribución de triglicéridos mas saturados.

TABLA I

Grado de insaturación de los ácidos grasos de lípidos totales, triglicéridos y fosfolípidos de hígado de los diferentes grupos de conejos.

	<u>lípidos totales</u>	<u>triglicé- ridos</u>	<u>fosfolí- pidos</u>
Controles	1,05	0,76	1,16
Tratados con insulina	1,02	0,78	1,12
Gestantes	0,88	0,72	1,21
Fetos	0,79	0,81	0,67

También se ha estudiado la composición de ácidos grasos totales, de triglicéridos y fosfolípidos en hígado de fetos a término. La figura 16 muestra la composición de ácidos grasos totales de hígado fetal (16 C_f) comparada con la del control adulto. Se observa que el hígado fetal posee concentraciones superiores de los ácidos grasos monoinsaturados 16:1 y 18:1, mientras que disminuye claramente el poliinsaturado 20:4; los niveles de ácido esteárico son significativamente mas bajos que los del hígado materno. Estas concentraciones de ácidos grasos dan como resultado un valor del grado de insaturación de los lípidos totales del hígado fetal que es inferior al del hígado materno (Tabla I).

Los lípidos fetales se fraccionaron también en triglicéridos y fosfolípidos y su composición se ha comparado también con la de los adultos control (A). Los valores relativos del grado de insaturación de ambas clases de lípidos de hígado fetal se expresan en la Tabla I. El valor superior del grado de insaturación de los triglicéridos del hígado fetal es debido al descenso en la concentración de ácido palmítico con respecto a los triglicéridos maternos. Los ácidos grasos de los fosfolípidos fetales se cacterizan por su reducido grado de insaturación, notablemente inferior al de los fosfolípidos de las conejas control y gestantes, y es inferior incluso al de los triglicéridos del hígado fetal, lo cual constituye un aspecto interesante de los lípidos fetales. La composición porcentual de ácidos grasos de los fosfolípidos de hígado fetal (Figura 18 C_f) se caracteriza sobre todo por los bajos niveles de los ácidos poliinsaturados 18:2 y 20:4 en relación a los fosfolípidos maternos.

Las comparaciones entre la composición de ácidos grasos de las clases de lípidos fetales (figuras 17 C_f y 18 C_f) y las de lípidos maternos (figuras 14 B y 15 B) y lípidos de conejas control (figuras 14 A y 15 A) permiten deducir que la composición de ácidos grasos de los triglicéridos del hígado fetal (figura 17) es mas similar a la del adulto normal que a la composición de los triglicéridos del hígado materno. Sin embargo, la composición de

ácidos grasos de fosfolípidos del hígado fetal (figura 18) presenta marcadas diferencias con respecto a los fosfolípidos tanto de adultos control como gestantes; esta diferencia es debida al descenso en los porcentajes relativos de ácidos grasos insaturados que hace a los fosfolípidos fetales considerablemente mas saturados que los maternos.

Se realizaron estudios similares en hígado de animales tratados con insulina y de animales gestantes tratados con insulina. Como ya se ha mencionado, la administración de insulina no modifica la composición de ácidos grasos totales (figura 13 B), y tampoco se observan cambios en la composición de ácidos grasos de triglicéridos (figura 14 B) ni en la de fosfolípidos (figura 15 B). Por otra parte, el efecto que sobre la composición de ácidos grasos de lípidos totales y de las clases de lípidos ejerce la gestación no se altera practicamente como consecuencia de la administración de insulina durante un periodo prolongado de tiempo (figuras 13 D, 14 D y 15 D).

La administración de insulina a las conejas gestantes tampoco influye sobre la composición de los lípidos de hígado fetal, ni en lípidos totales (figura 16 D_f) ni en las clases de lípidos (figuras 17 D_f y 18 D_f).

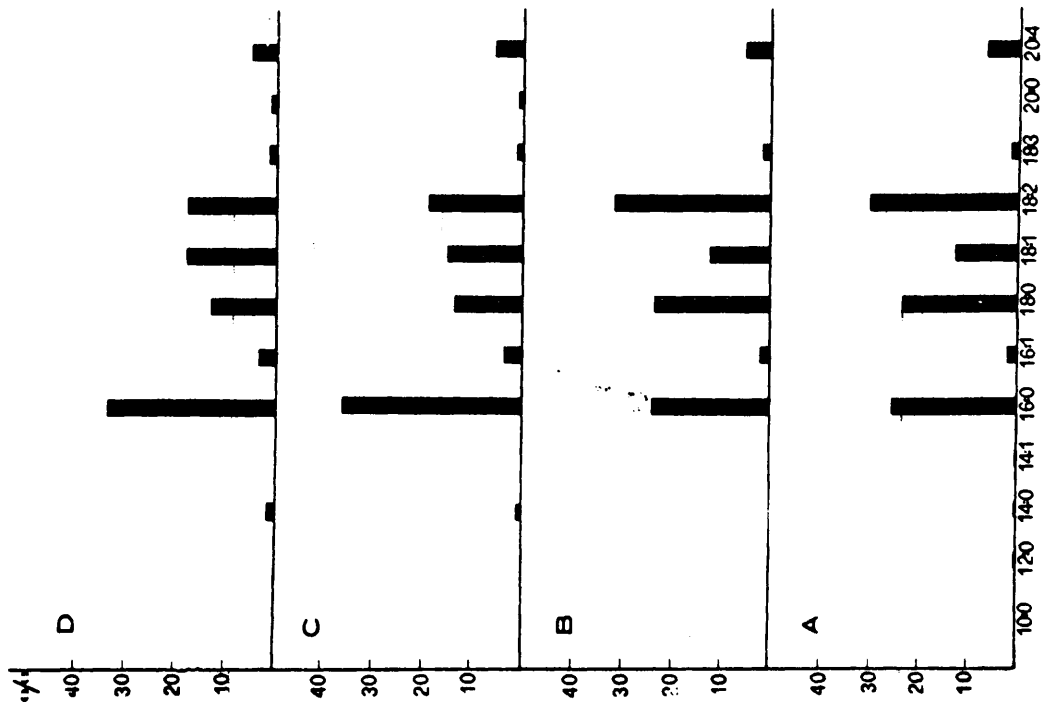


Fig. 13. Composición de ácidos grasos totales en algado. A. Animales control. B. Animales tratados con insulina. C. Animales gestantes. D. Animales gestantes tratados con insulina.

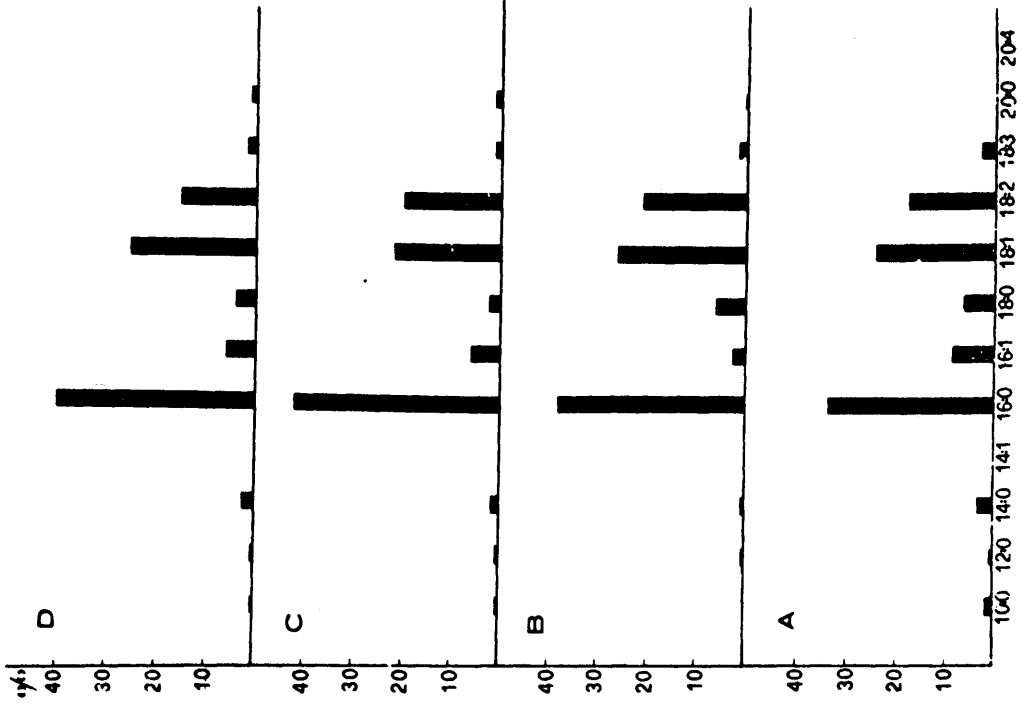


Fig. 14. Composición de ácidos grasos de triololéicos de hígado. Explicaciones como en la figura 13.

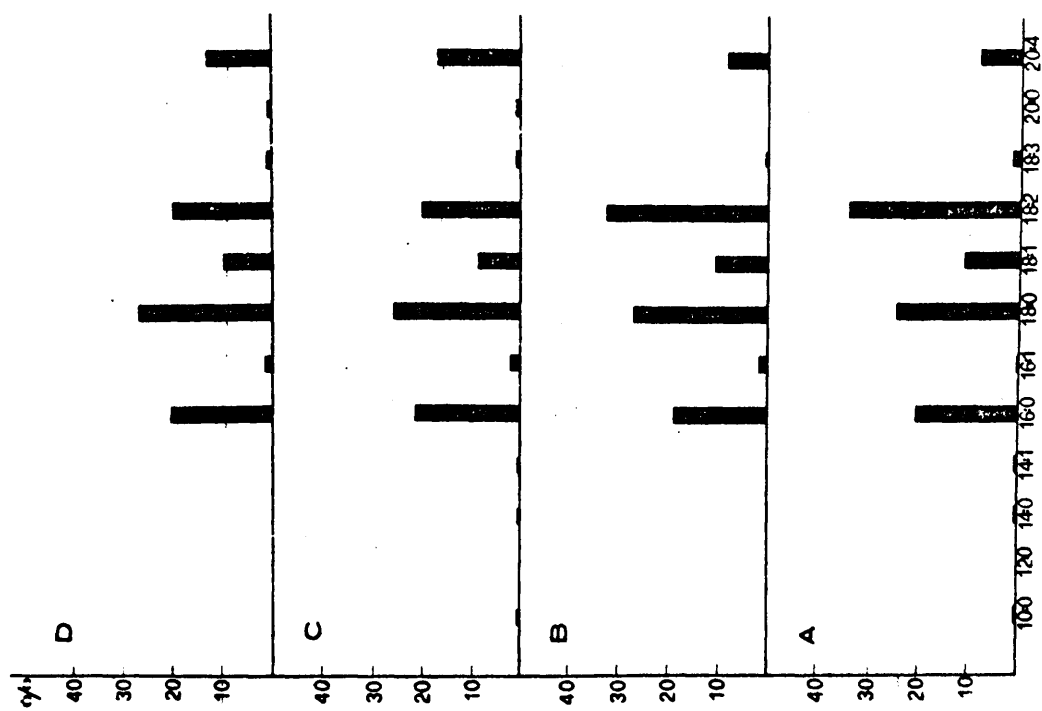


Fig. 15. Composición de ácidos grasos de los folículos de la ova-
do. Explicaciones como en la figura 13.

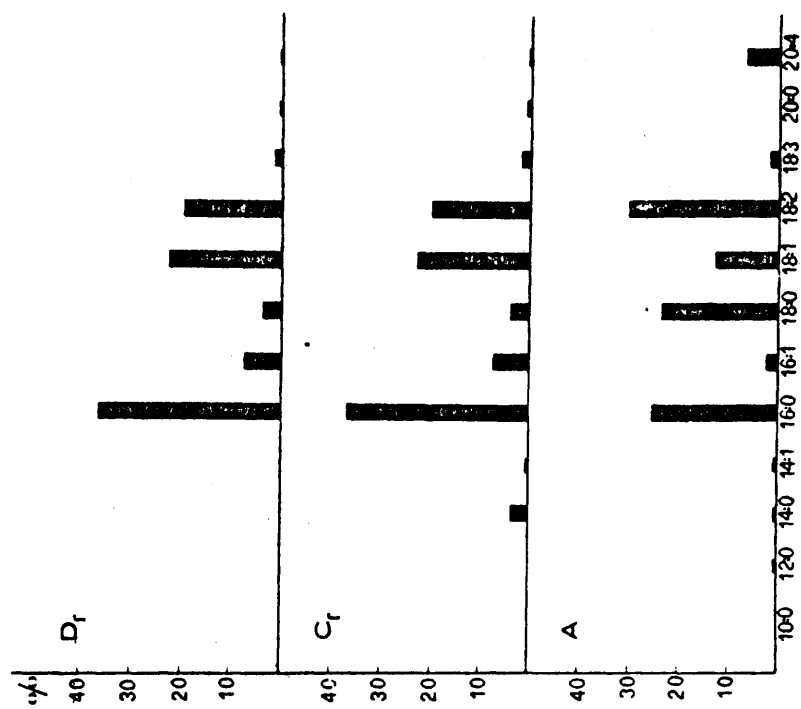


Fig. 16. Composición de ácidos grasos totales de hígado. A
Animales control. C: Hígado de fetos de animales gestantes con
troi. D: Hígado de fetos de animales gestantes tratados con in-
salina.

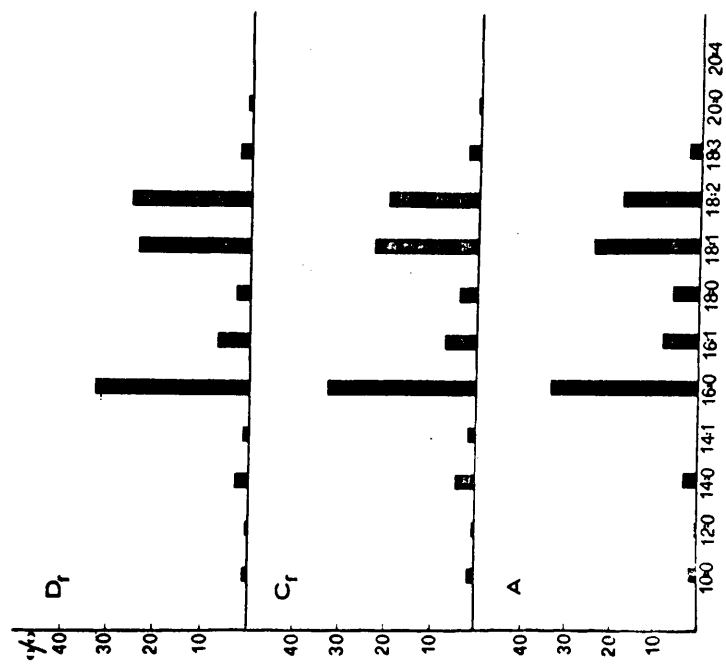


Fig. 17. Composición de ácidos grasos de triglicéridos de hígado. Explicaciones como en la figura 16.

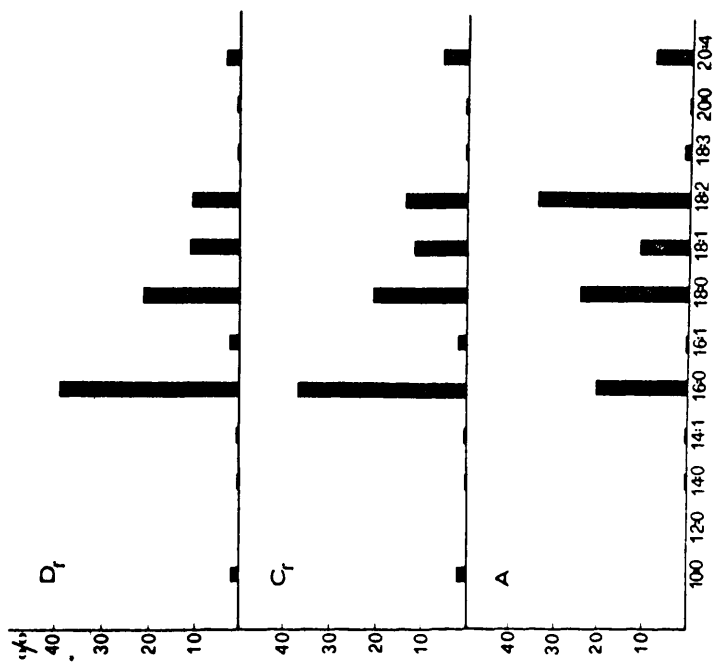


Fig. 18. Composición de ácidos grasos de fosfolípidos de hígado. Explicaciones como en la figura 16.

127

3.3 DISTRIBUCION DE ACIDOS GRASOS EN FOSFATIDILCOLINA DE HIGADO Y PULMON DE CONEJOS ADULTOS NORMALES, GESTANTES Y FETOS.

La figura 19 muestra la distribución de ácidos grasos en fosfatidilcolina de hígado de conejos adultos control (A) y gestantes (B). Las diferencias entre ambos concuerdan con los resultados anteriores referidos a la composición de ácidos grasos en fosfolípidos totales; así, los ácidos insaturados 18:2 y 20:4 son los responsables de estas diferencias en fosfolípidos totales y en fosfatidilcolina de hígado. La distribución de ácidos grasos entre las posiciones 1 y 2 de la fosfatidilcolina de hígado no se afecta por la gestación.

La distribución de ácidos grasos entre las posiciones 1 y 2 de las fosfatidilcolinas aisladas de hígado de fetos se da en la figura 20. Estos resultados muestran que la relación de ácidos grasos saturados presentes en la posición 1 a los de la posición 2 es notablemente inferior a la misma relación existente en hígado materno (tabla II)

TABLA II

Relación entre las posiciones 1/2 de ácido palmítico.

HIGADO			PULMON		
<u>Control</u>	<u>Madre</u>	<u>Feto</u>	<u>Control</u>	<u>Madre</u>	<u>Feto</u>
7.7	7.9	2.0	2.7	2.2	1.9

La administración de insulina durante un periodo de tiempo prolongado no modifica la distribución de ácidos grasos en fosfatidilcolina en hígado materno ni en hígado fetal,

La figura 21 muestra la distribución de ácidos grasos en

fosfatidilcolina de pulmón de conejos control (A) y gestantes (B). La figura 22 presenta la distribución de ácidos grasos en fosfatidilcolina de pulmón fetal. Hay que destacar el hecho de que la abundante presencia de ácido palmítico en pulmón provoca que una gran proporción de este ácido esté localizada en la posición 2 de los fosfolípidos de pulmón materno y control; esto hace que la relación de ácido palmítico entre las posiciones 1/2 sea menor en pulmón que en hígado (tabla II).

Estos resultados están de acuerdo con el descubrimiento de Veryken et al. (1.972) sobre los mecanismos que actúan en la biosíntesis de fosfatidilcolinas en hígado y pulmón de rata. Estos autores destacan la significativa incorporación de ácido palmítico en la posición 2 de 1-palmitoil-sn-glicero-3-fosforilcolina en presencia de microsomas de pulmón, en contraste con los microsomas de hígado que provocan solo una muy limitada incorporación de ácido palmítico. Así pues, parece ser que en la formación de dipalmitoil-lecitina en pulmón desempeña un papel importante un mecanismo de desacilación-reacilación, mientras que en la formación de moléculas de lecitina que contienen ácido linoleico en hígado funciona primordialmente un mecanismo "de novo".

Los valores de la relación entre las posiciones 1/2 del ácido palmítico (tabla II) obtenidas en fosfatidilcolinas de hígado y pulmón de adulto control y adulto gestante están de acuerdo con aquellas observaciones; sin embargo, los valores de estas relaciones son prácticamente idénticos en fosfatidilcolina de hígado y pulmón de feto, siendo ambos muy similares a los del pulmón adulto. Es decir, está claro que la fosfatidilcolina de hígado fetal tiene una distribución de ácido palmítico muy similar a la del pulmón a término que todavía no respira. Este hecho está en la línea de los descritos por Gluck et al. (1.970) según los cuales el feto de conejo a término almacena grandes cantidades de dipalmitoil-lecitina así como otras lecitinas, incluyendo algunas especies moleculares que son liberadas a la superficie alveolar después del inicio de la respiración. Sin embargo, el determinar si

un mecanismo de desacilación-reacilación es importante en la sí
ntesis de palmitoil-lecitinas en hígado fetal es una cuestión que
debe ser resuelta todavía.

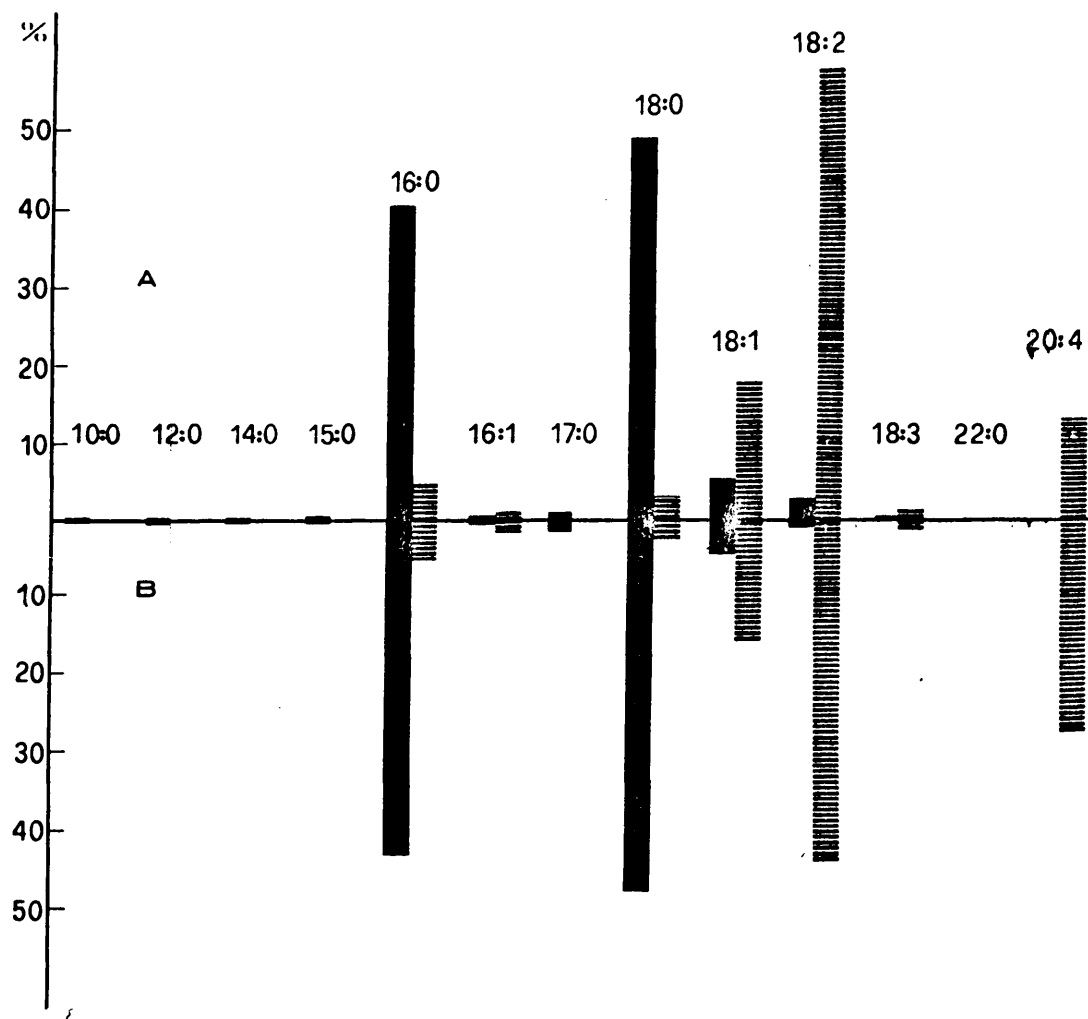


Fig. 19. Distribución de ácidos grasos en fosfatidilcolina de hígado de conejas control (A) y gestantes (B). Barras negras = posición 1; barras rayadas = posición 2.

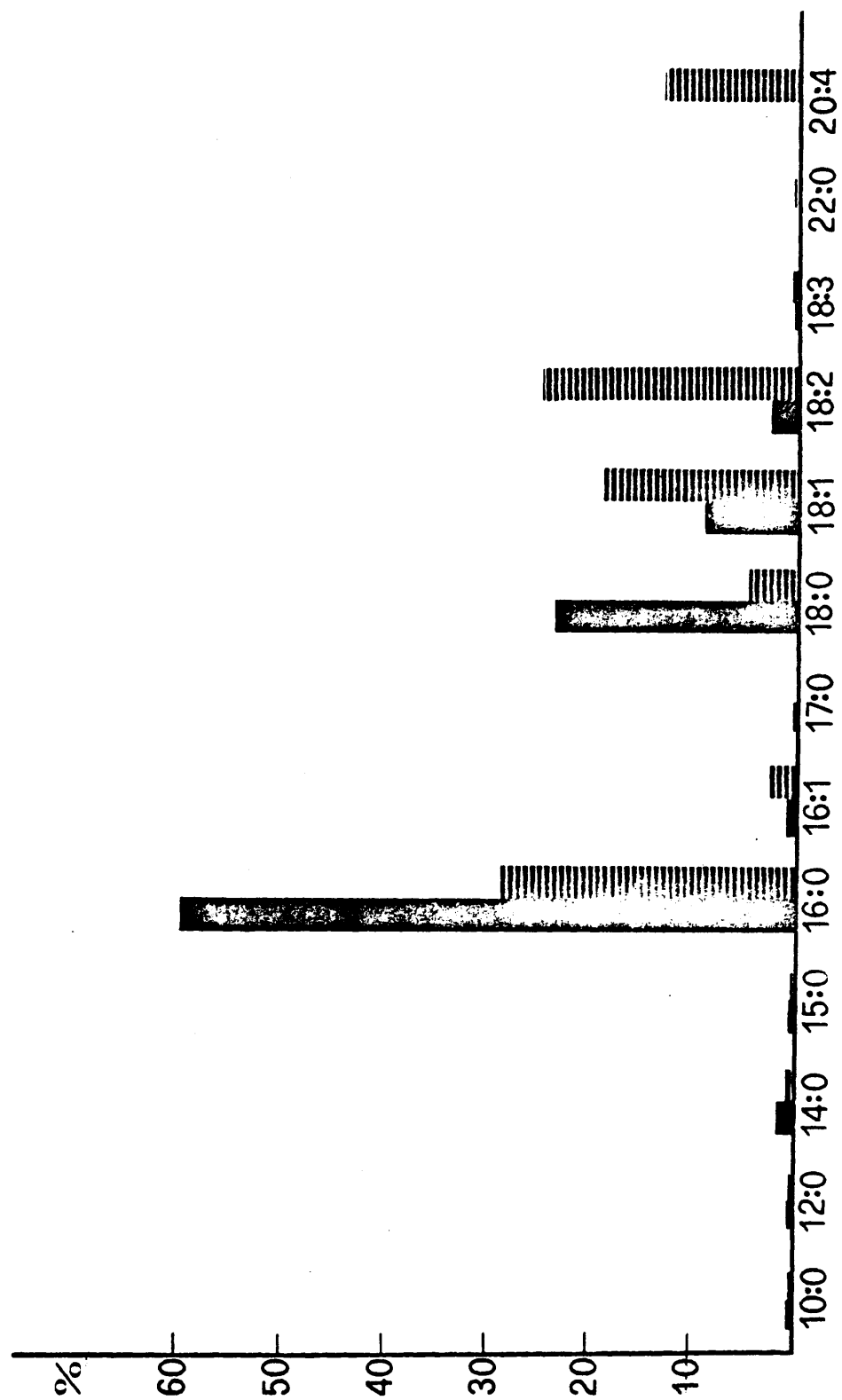


Fig. 20. Distribución de ácidos grasos en fosfatidilcolina de hígado fetal. Símbolos como en la figura 19.

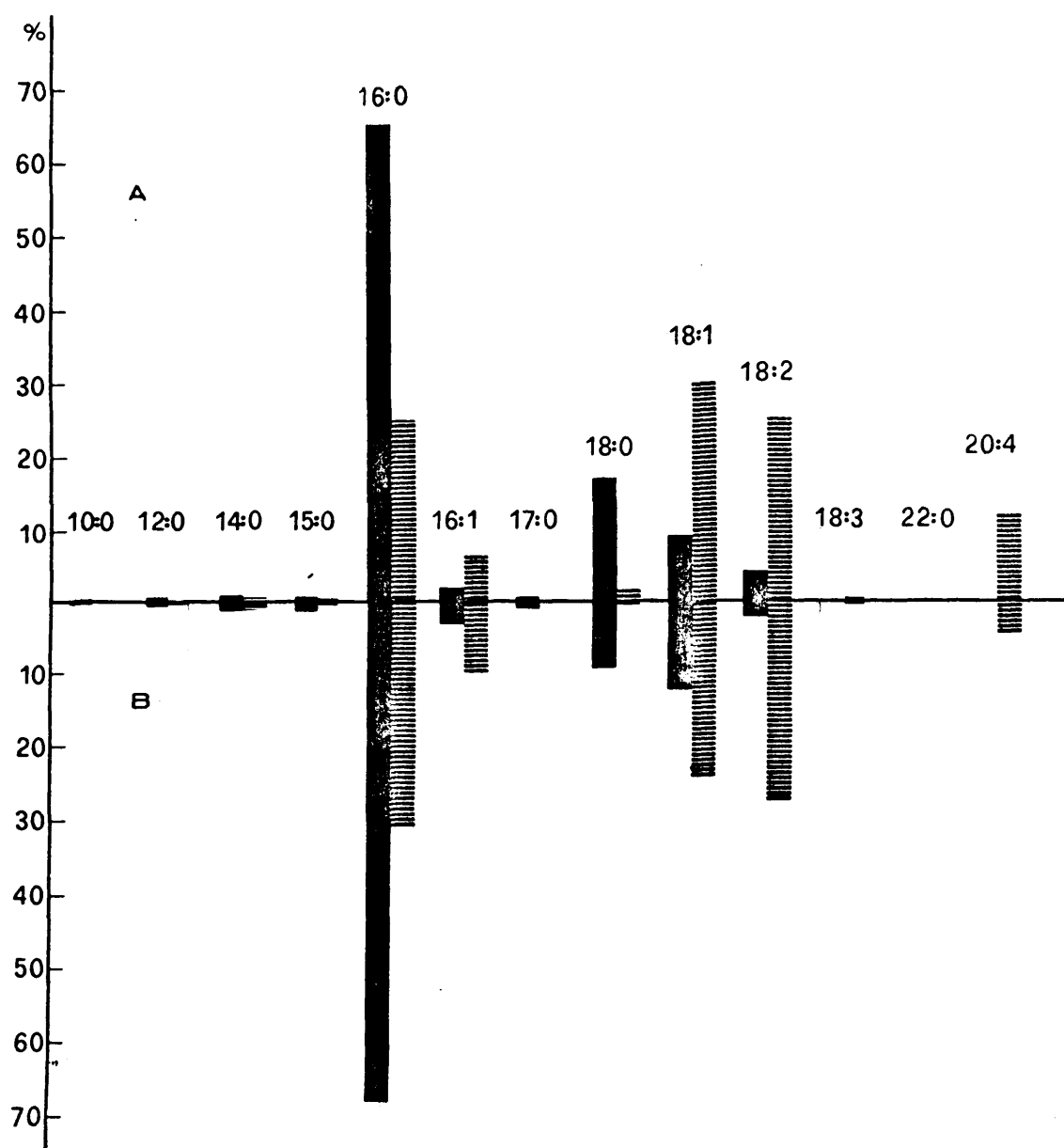


Fig. 21. Distribución de ácidos grasos en fosfatidilcolina de pulmón de conejas control (A) y gestantes (B). Simbolos como en la figura 19.

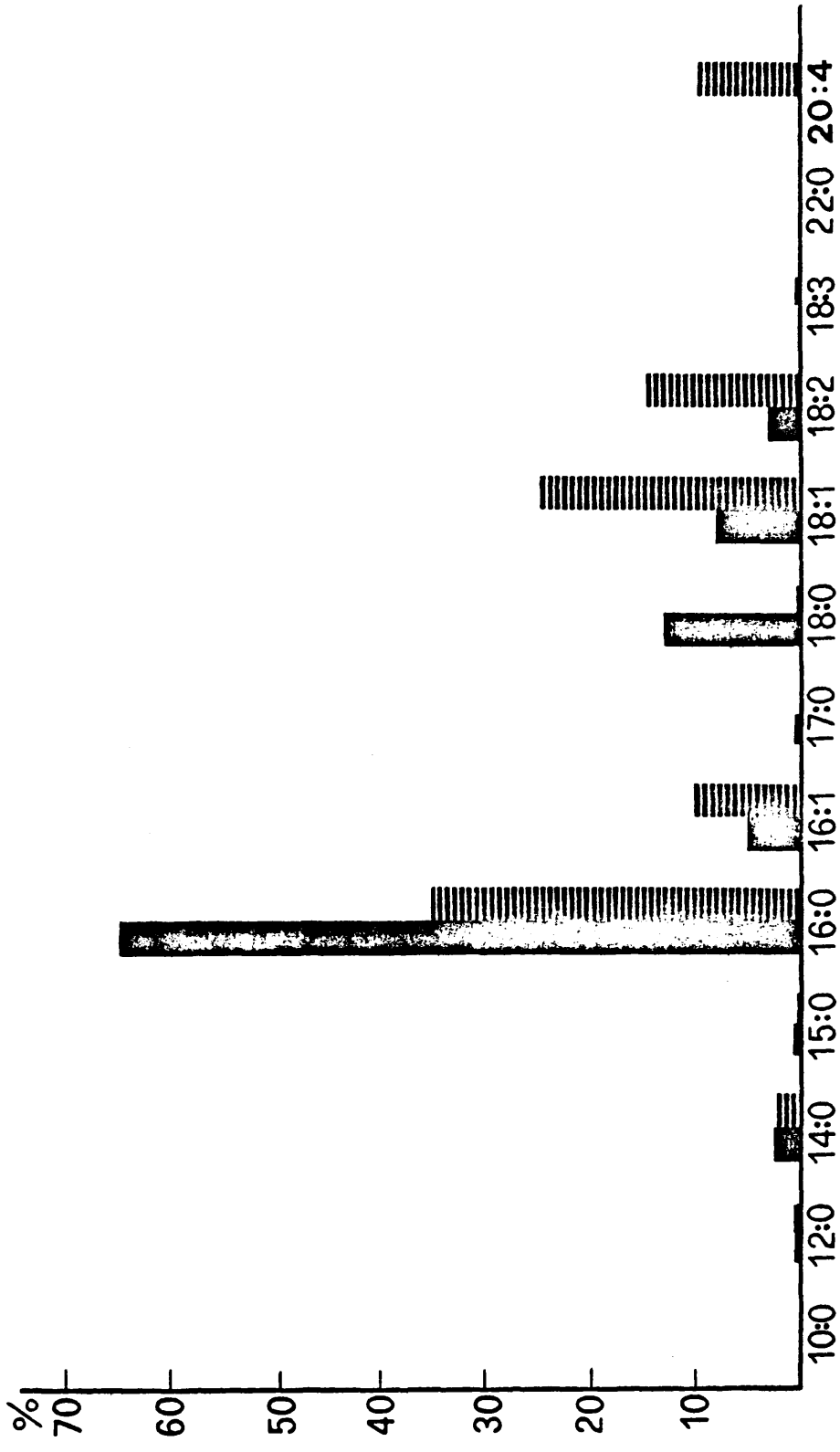


Fig. 22. Distribución de ácidos grasos en fosfatidilcolina de pulmón fetal. Símbolos como en la figura 19.

3.4 DISTRIBUCION DE ACIDOS GRASOS EN FOSFATIDILETANOLAMINA DE HIGADO Y PULMON DE CONEJOS ADULTOS NORMALES, GESTANTES Y FETOS.

La figura 23 presenta la distribución de ácidos grasos en fosfatidiletanolamina de hígado de conejas control (A) y gestantes (B). Las diferencias en la composición de ácidos grasos totales entre ambos tipos de animales están de acuerdo con los resultados presentados anteriormente, relativos a la composición de fosfolípidos totales (sección 3.2). Así, por ejemplo, la fuerte disminución de 18:2 debida a la gestación se refleja claramente en la composición de ácidos grasos de fosfatidiletanolamina que, por otra parte, muestra un incremento en el ácido graso poliinsaturado 20:4. Estas diferencias sobre todo la menor proporción de 18:2 en hígado gestante, han sido observadas también en fosfatidilcolina, según se ha señalado en la sección anterior.

La distribución cuantitativa de ácidos grasos entre las posiciones 1 y 2 de fosfatidilcolina de hígado no se afectaba por la gestación, pero sin embargo se observa una diferencia cuantitativa en esta relación en fosfatidiletanolamina; la gestación provoca un descenso de dicha relación tanto en los ácidos grasos saturados 16:0 y 18:0 como para los insaturados 18:1 y 18:2, debido respectivamente, a un incremento de sus proporciones en la posición 2 y a un descenso de sus proporciones en la posición 1.

La figura 24 muestra la distribución de ácidos grasos en fosfatidiletanolamina de pulmón de conejas control (A) y gestantes (B). Esta distribución no se afecta cuantitativamente por la gestación, salvo un ligero descenso del ácido esteárico, de modo semejante a lo que ocurría en fosfatidilcolina. La abundante presencia de ácido palmítico en pulmón provoca que una gran proporción de este ácido esté localizada en la posición 2 de fosfatidilcolina de pulmón tanto en las conejas control como en las gestantes. Sin embargo esto no ocurre en fosfatidiletanolamina de pulmón de estos dos tipos de animales, por lo que la relación entre las posiciones 1/2 para este ácido es en ambos casos superior a

la encontrada en fosfatidilcolina.

La figura 25 presenta la distribución de ácidos grasos en hígado y pulmón fetales. Estos resultados muestran que para ácidos grasos saturados la relación entre las proporciones localizadas en las posiciones 1 y 2 de fosfatidiletanolamina de hígado fetal es notablemente inferior a la relación existente en hígado control y en hígado materno (tabla III); este hecho es similar al observado para ácido palmítico en fosfatidilcolina de hígado fetal. Sin embargo, la relación entre las proporciones de la posición 1 y de la posición 2 de los principales ácidos grasos saturados (16:0 y 18:0) en fosfatidiletanolamina de pulmón fetal alcanza valores superiores al de la fosfatidiletanolamina de hígado fetal, siendo también superiores a los de pulmón de las conejas control y gestantes (tabla III). Este incremento en la relación entre las posiciones 1/2 es debido a una fuerte disminución de los ácidos grasos saturados localizados en la posición 2. Estos resultados no coinciden con las relaciones materno-fetales descritas en la sección anterior para fosfatidilcolina de pulmón.

TABLA III

Relación entre las posiciones 1/2 de ácidos grasos saturados.

Fosfo- lípidos	Ácidos grasos	HIGADO			PULMON		
		control	madre	feto	control	madre	feto
PC	16:0	7,7	7,9	2,0	2,7	2,2	1,9
PE	16:0	11,0	6,0	2,0	4,6	5,9	7,0
PE	18:0	13,0	7,4	5,3	10,0	10,0	26,0

PE= fosfatidiletanolamina ; PC= fosfatidilcolina

Se señalaba en la sección anterior que la abundante presencia de ácido palmítico en la posición 2 de fosfatidilcolina de pulmón de conejas control y gestantes podría ser debida al hecho señalado por Vereyken et al. (1.972) de la participación de un mecanismo de desacilación-reacilación en la biosíntesis de dipalmitoil-lecitinas por microsomas de pulmón. El valor de la relación entre las posiciones 1/2 para ácido palmítico en fosfatidilcolina de hígado fetal, similar a las del pulmón materno y fetal, permite sugerir también la participación de un mecanismo de desacilación-reacilación en la síntesis de dipalmitoil-lecitinas en hígado fetal. Sin embargo, los resultados obtenidos en la distribución de ácido palmítico en fosfatidiletanolamina de pulmón fetal no son consecuentes con una incorporación preferente de palmitato mediante acilación de liso-fosfatidiletanolamina, sino con el mecanismo "de novo" para la biosíntesis de fosfolípidos. Así pues, la ausencia de aciltransferasas específicas para fosfatidiletanolamina explicaría la inaccesibilidad de una segunda molécula de palmitato o estearato para unirse a la posición 2 del fosfolípido. Los valores de las relaciones entre las posiciones 1/2 para los ácidos palmítico y esteárico en fosfatidiletanolamina de pulmón fetal, mayores que las existentes en el fosfolípido materno, indicarían una menor participación de las reacciones de intercambio en el pulmón fetal.

Los resultados expresados en la figura 25 indican también la presencia en fosfatidiletanolamina de hígado y pulmón fetales de cantidades significativas de ácidos grasos insaturados de cadena larga localizados exclusivamente en la posición 2, los cuales no están presentes en las correspondientes fosfatidilcolinas. Este hecho resalta de nuevo el diferente comportamiento metabólico de la fosfatidilcolina y de la fosfatidiletanolamina fetales. Otro hecho característico es la presencia en fosfatidiletanolamina de pulmón fetal de elevadas proporciones de ácidos grasos impares, concretamente el ácido 15:0, y del ácido poliinsaturado 20:4,

La administración prolongada de insulina no modifica la distribución de ácidos grasos en fosfatidiletanolamina de hígado y pulmón ni en conejas adultas ni en fetos.

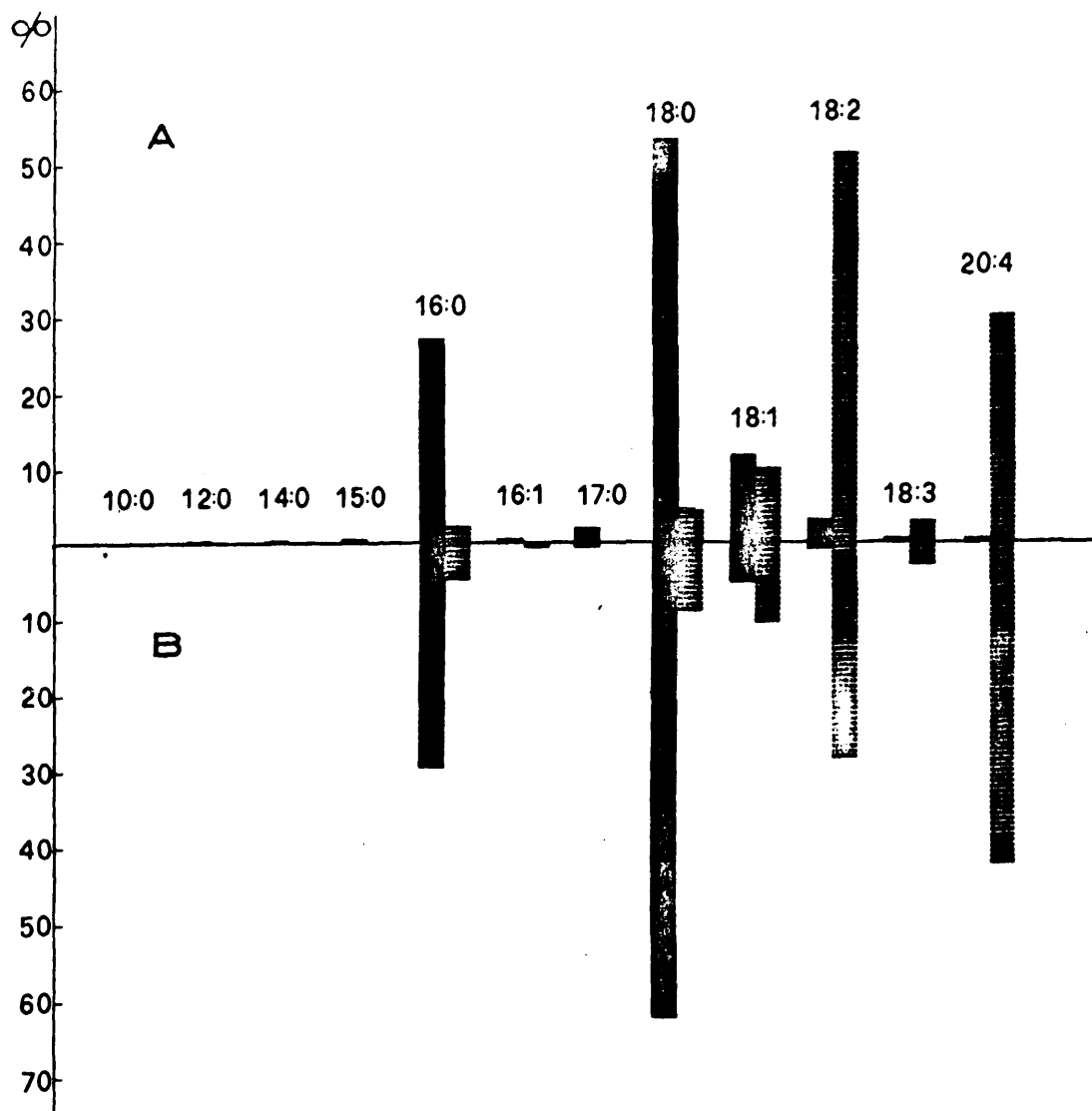


Fig. 23. Distribución de ácidos grasos en fosfatidiletanolamina de hígado de conejas control (A) y gestantes (B). Barras negras = posición 1; barras rayadas = posición 2.

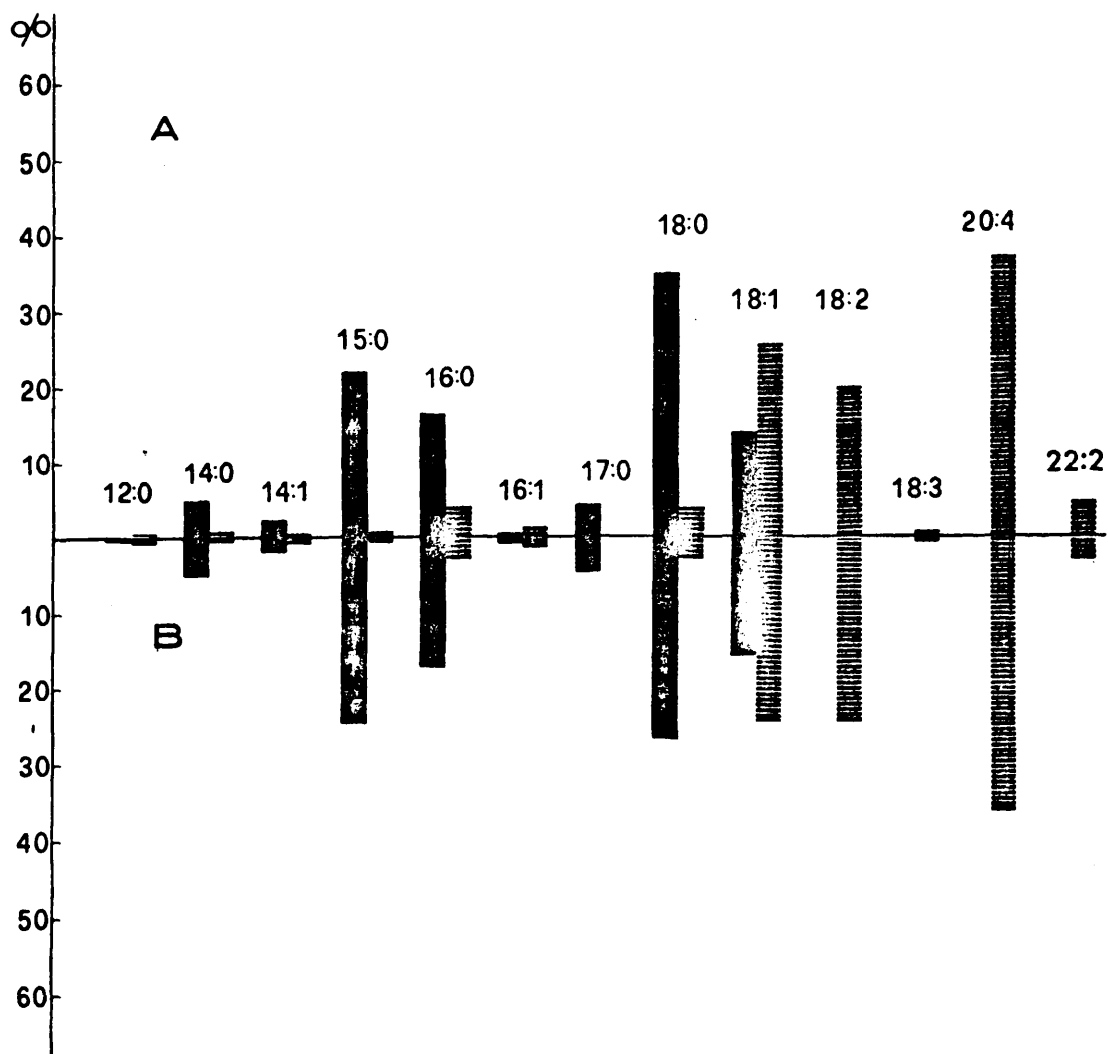


Fig. 24. Distribución de ácidos grasos en fosfatidiletanolamina de pulmón de conejas control (A) y gestantes (B). Símbolos como en la figura 23.

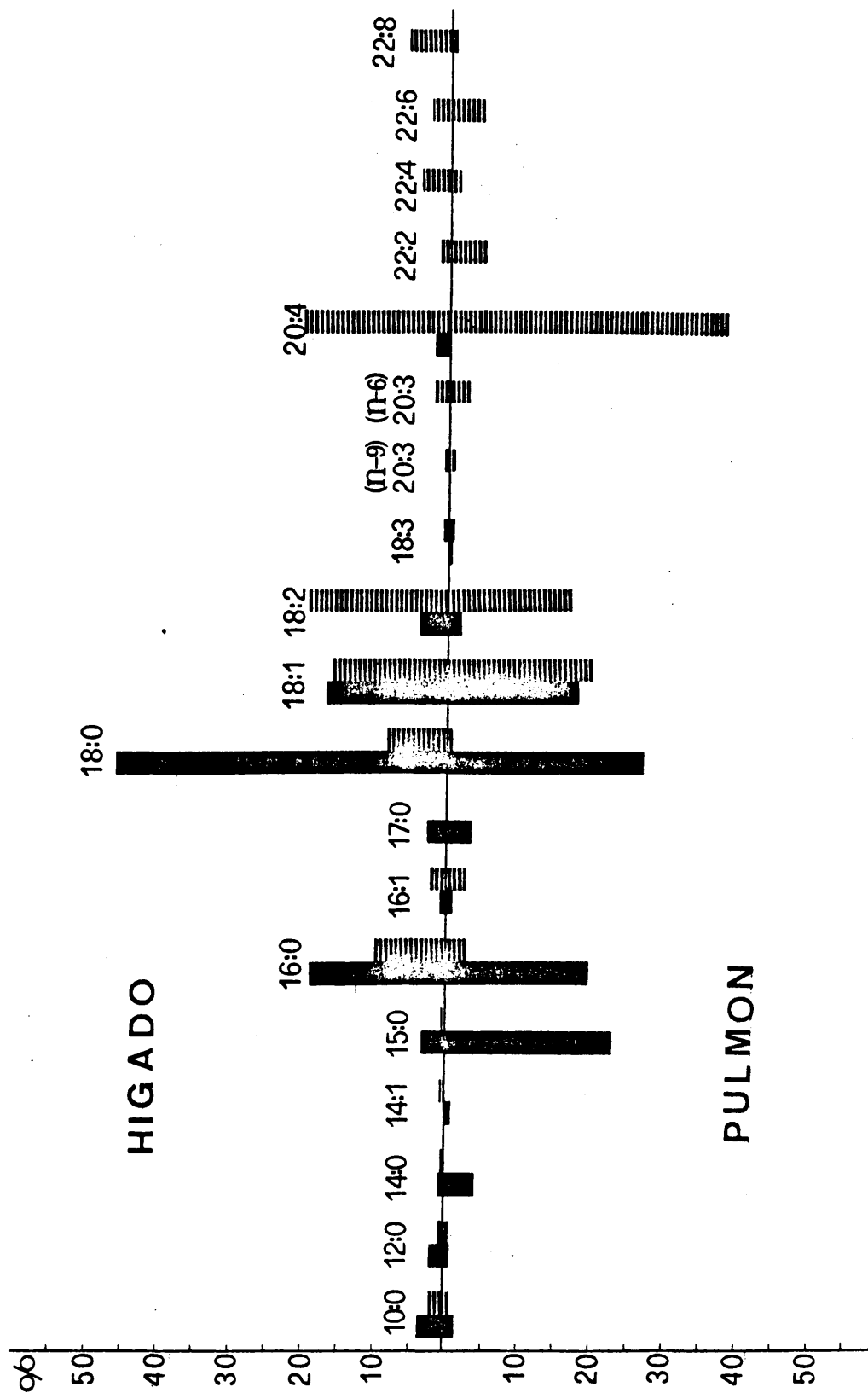


Fig. 25. Distribución de ácidos grasos en fosfatidiletanolamina de hígado y pulmón fetales. Símbolos como en la figura 23.

3.5. EFECTO DE LA GESTACION SOBRE LA DISTRIBUCION PARCIAL DE ACIDOS GRASOS EN TRIGLICERIDOS DE HIGADO Y PULMON DE CONEJOS ADULTOS. COMPOSICION DE TRIGLICERIDOS DE HIGADO Y PULMON FETALES.

Según se ha visto en la sección 3.2, la gestación modifica la composición de ácidos grasos de los lípidos totales de hígado en conejos, siendo los cambios mas notables el incremento de la proporción de ácido palmítico y el descenso de las de esteárico y linoleico. Estos cambios son debidos a las variaciones en la composición de triglicéridos y fosfolípidos; los triglicéridos son responsables de los cambios que la gestación provoca en las concentraciones relativas de los ácidos grasos saturados 16:0 y 18:0.

La composición de los triglicéridos del hígado fetal es mas similar a la del adulto normal que a la del hígado materno (tabla IV). Así, se puede observar que en los triglicéridos de hígado de conejas gestantes los niveles de 16:0 son mayores y los de 18:0 menores que en las conejas control. Los restantes ácidos grasos no presentan variaciones significativas. En general, la composición de ácidos grasos de los triglicéridos de hígado fetal es semejante a la de los triglicéridos de hígado de las conejas control.

TABLA IV

Porcentajes de ácidos grasos en triglicéridos de hígado de conejas control, conejas gestantes y fetos.

Conejos	14:1	15:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
Control	3,0	0,7	36,2	7,6	7,5	23,6	20,0	1,1
Gestante	3,0	1,4	45,4	6,3	2,8	21,8	18,2	1,1
Fetos	2,8	1,3	33,9	6,8	3,5	24,1	22,7	2,4

La figura 26 muestra la distribución parcial de ácidos grasos en las posiciones (1+3) y 2 de los triglicéridos de hígado de conejas control (A) y gestantes (B). La figura 27 muestra la distribución parcial correspondiente al pulmón de conejas control (A) y gestantes (B). En la figura 28 se muestran comparativamente las distribuciones parciales de ácidos grasos en hígado y pulmón fetales.

Los hechos mas característicos de la distribución posicional de ácidos grasos en triglicéridos de hígado control (figura 26 A) son las localizaciones preferentes de 16:0 en la posición (1+3) y de los ácidos monoinsaturados 16:1 y 18:1 en la posición 2. Los ácidos poliinsaturados, 18:2 y 18:3, no están localizados en la posición 2 tan específicamente como los ácidos grasos monoinsaturados. El incremento de ácido palmítico en los triglicéridos de hígado provocado por la gestación aparece solo claramente presente en la posición (1+3) (figura 26 B).

Por otra parte, existe una clara tendencia hacia una mayor especificidad en la distribución de los ácidos grasos insaturados 18:1 y 18:2 en los triglicéridos de hígado de conejas gestantes. La observación de la figura 28 muestra una especificidad notablemente menor en la distribución de ácidos grasos en las posiciones (1+3) y 2 de los triglicéridos de hígado de conejas control y gestantes; en cualquier caso, la distribución parcial en los triglicéridos fetales es mas similar a la de los triglicéridos control que a la de los triglicéridos maternos. El ácido palmitoleico, sin embargo, aparece idénticamente distribuido en triglicéridos de hígado control y de hígado materno y fetal.

Estos resultados parecen indicar la participación en hígado fetal y adulto de mecanismos de síntesis de triglicéridos con una diferente especificidad según los ácidos grasos.

En la tabla V se expresa la composición de ácidos grasos de triglicéridos de pulmón de conejas control, conejas gestantes y fetos. Resulta evidente que la gestación no induce variaciones

significativas en la composición de ácidos grasos de los triglicéridos. Los de pulmón fetal tienen proporciones mayores de ácido palmítico y menores de esteárico que los de pulmón adulto.

TABLA V

Porcentajes de ácidos grasos en triglicéridos de pulmón de conejas control, gestantes y fetos.

Conejos	14:1	15:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
Control	3,2	1,2	32,4	8,1	6,2	24,7	21,5	2,5
Gestantes	3,6	1,1	29,9	8,5	4,0	25,9	21,8	4,2
Fetos	4,2	1,0	37,3	6,6	2,9	23,3	18,6	2,5

La figura 27 muestra las distribuciones parciales de ácidos grasos en triglicéridos de pulmón de conejas control (A) y gestantes (B). Los triglicéridos de pulmón de conejas control muestran la misma especificidad general que los triglicéridos de hígado. Sin embargo, los ácidos palmítico y oléico no están localizados tan preferentemente en las posiciones (1+3) y 2 respectivamente. La gestación modifica la distribución posicional de ácidos grasos en los triglicéridos de pulmón, provocando una menor especificidad en la localización relativa de los ácidos grasos en las posiciones (1+3) y 2. Esta tendencia a igualar la distribución de ácidos grasos entre las posiciones (1+3) y 2 se observa claramente en los triglicéridos del pulmón fetal (figura 28); esto hace que las distribuciones parciales de ácidos grasos sean muy similares en triglicéridos de hígado y pulmón fetales.

La comparación de todos estos cambios en la distribución parcial de ácidos grasos en triglicéridos de hígado y pulmón de conejos adultos y fetos permite deducir algunas tendencias de tipo general. La gestación induce cambios en la distribución parcial de ácidos grasos de triglicéridos de ambos órganos. Estos cambios, sin embargo, se producen de forma opuesta, de modo que las diferencias de concentraciones de los ácidos grasos localizados en las posiciones (1+3) y 2 se elevan en hígado y disminuyen en pulmón de las conejas gestantes (figuras 26 y 27). Sin embargo, las distribuciones parciales de los triglicéridos fetales de hígado y pulmón son muy similares entre si (figura 28); también se observa una gran similitud entre las distribuciones parciales de ácidos grasos de triglicéridos de pulmón materno y fetal.

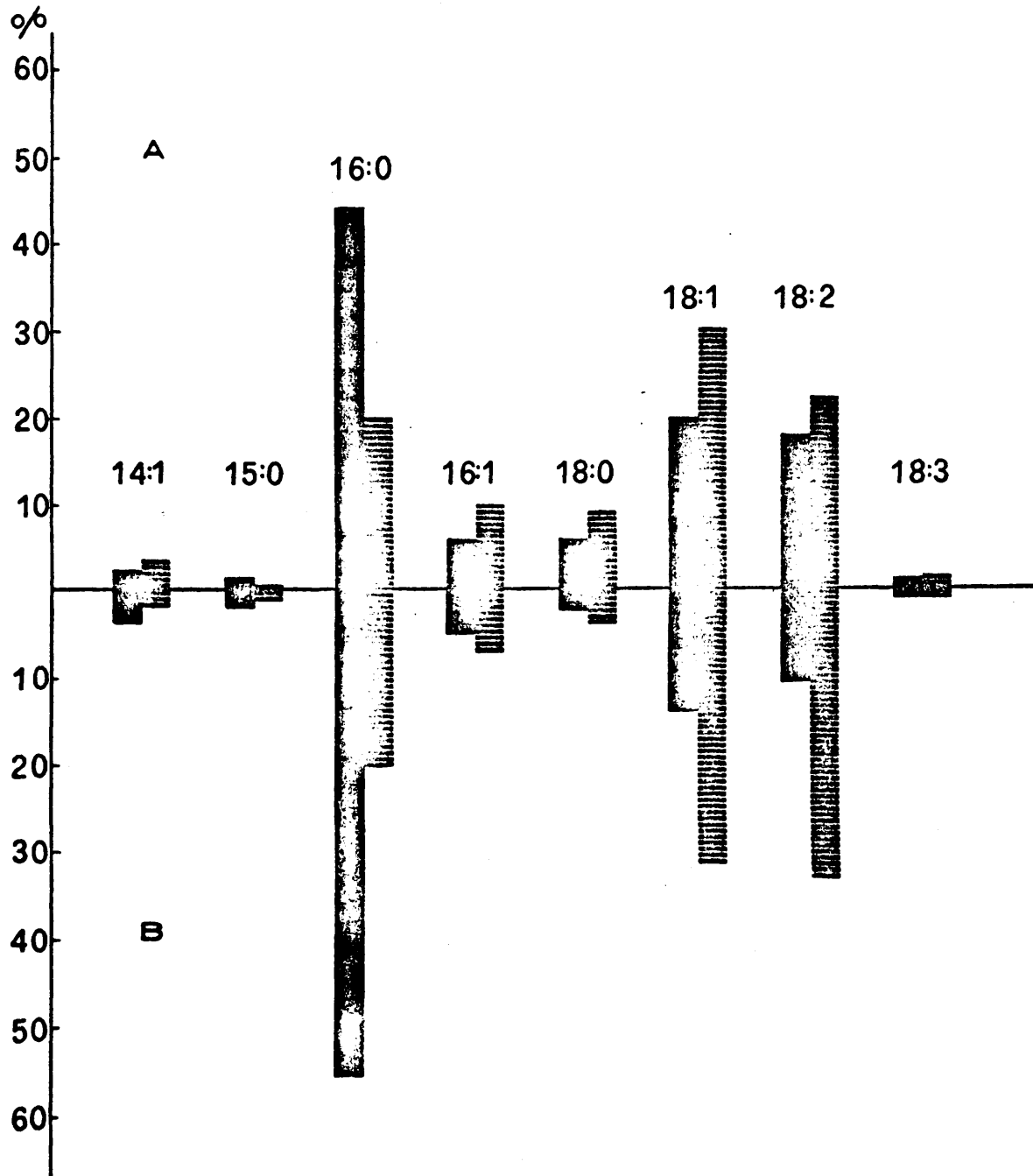


Fig. 26. Distribución parcial de ácidos grasos en triglicéridos de hígado de conejas control (A) y gestantes (B). Barras negras = posición (1 + 3); barras rayadas = posición 2.

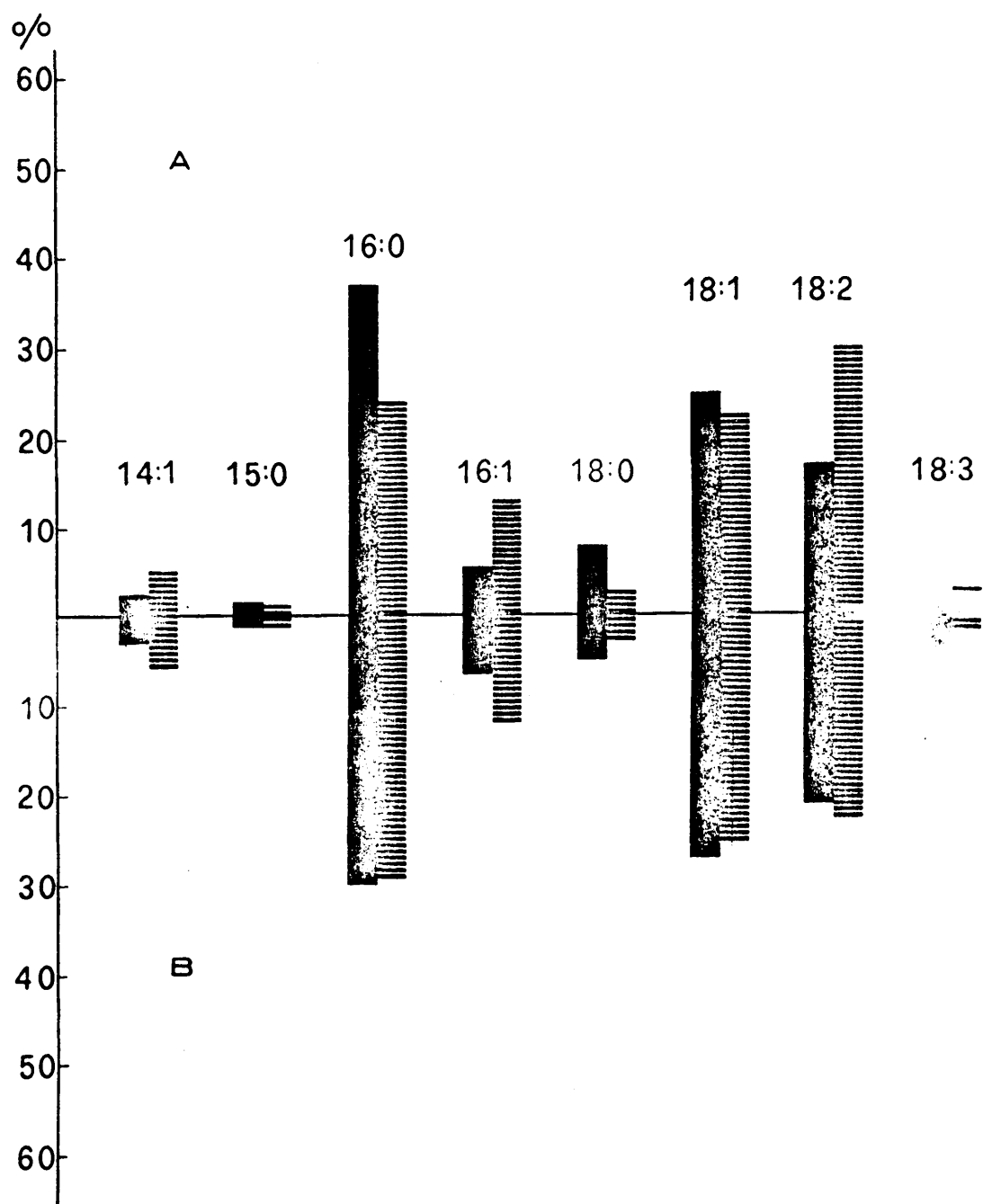


Fig. 27. Distribución parcial de ácidos grasos en triglicéridos de pulmón de conejas control(A) y gestantes (B). Simbo como en la figura 26.

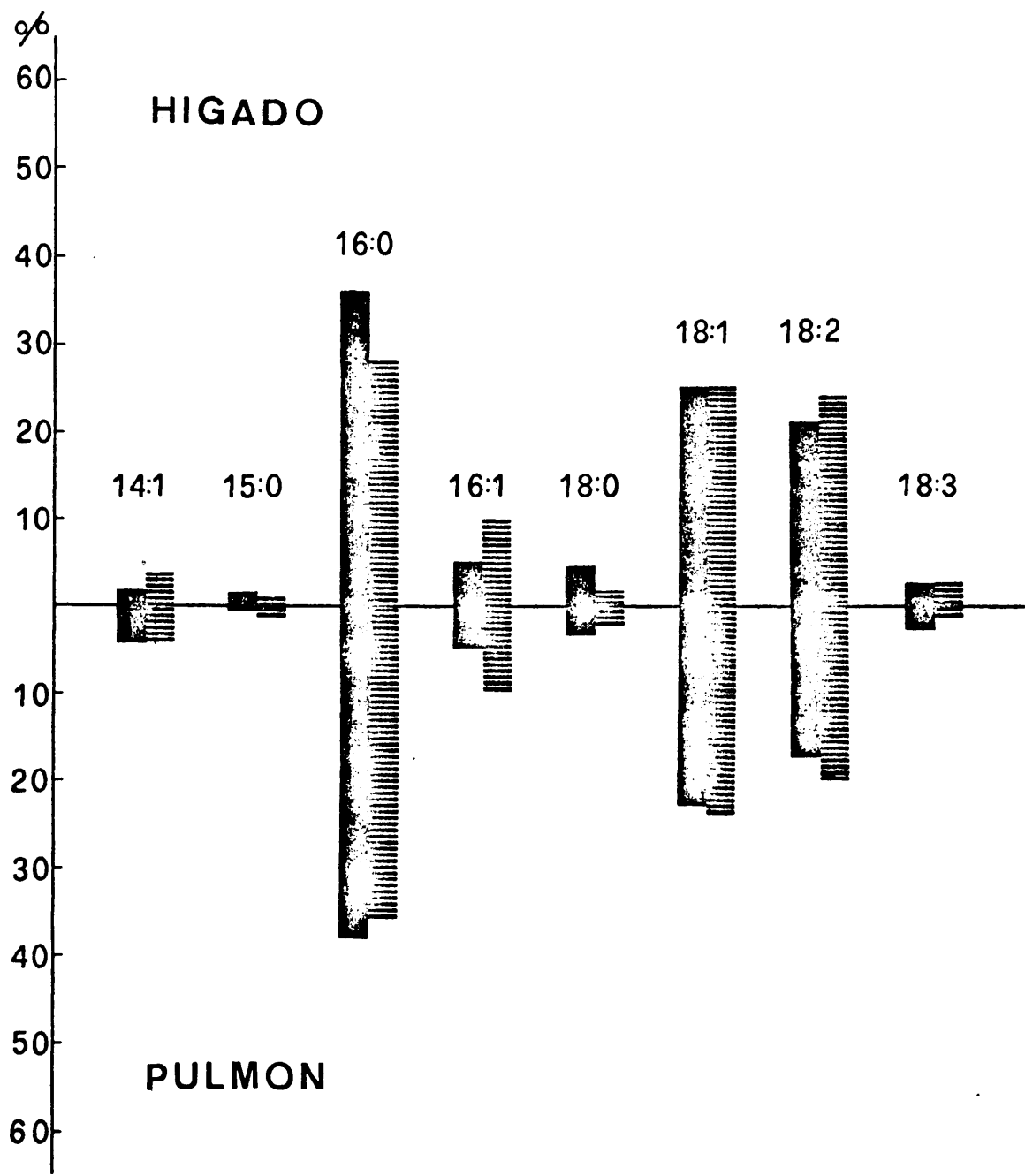


Fig. 28. Distribución parcial de ácidos grasos en triglicéridos de hígado y pulmón fetales. Símbolos como en la figura 26.

3.6 CINETICA DE GLICERIDOS PLASMATICOS EN CONEJOS. INFLUENCIA DE LA GESTACION Y ADMINISTRACION DE INSULINA.

Se ha estudiado la incorporación "in vivo" de Glicerol-2-³H a triglicéridos y fosfolípidos de suero en tres series diferentes de animales: controles no gestantes, gestantes y no gestantes tratados con insulina, como se indica en la parte correspondiente de Materiales y Métodos.

La administración del precursor radiactivo a animales control puso de manifiesto en todos los casos que los triglicéridos alcanzan un máximo de incorporación a 1 hora de la inyección con un descenso lento hasta las 9 horas, observándose, además, desde las 9 a las 24 horas unos niveles de incorporación practicamente estabilizados. Con respecto a los fosfolípidos no se observa un máximo perfectamente definido, como en el caso de los triglicéridos, por el contrario la incorporación tiene lugar de forma creciente pero lenta a partir de la primera media hora y hasta las 24 horas.

La figura 29 muestra la incorporación de glicerol tritiado en triglicéridos de suero de conejas gestantes y de conejas no gestantes tratadas con insulina. Con respecto a estas últimas, la incorporación máxima se produce a la hora de la inyección radiactiva y se observa, además, que dicha incorporación aumenta a medida que avanza el tratamiento con la hormona, que provoca también un descenso mas rápido a partir del máximo hasta las tres horas, alcanzándose a partir de aquí valores practicamente idénticos que descienden lentamente en las 6 horas siguientes. Se estudió asimismo la incorporación en los fosfolípidos de suero de animales tratados con insulina observándose un incremento muy ligero de incorporación con respecto a los animales control, sin variar por otra parte la cinética de la misma, que presenta el máximo crecimiento en la primera media hora.

Con respecto a la cinética de triglicéridos de animales gestantes (figura 29) se aprecian diferencias significativas tanto en los niveles de incorporación así como en el momento en que se alcanza el máximo de la misma. Dicho máximo, que hasta el día 21 de gestación se encuentra a una hora de la inyección, se alcanza, a partir del día 26 a la media hora. El que a partir de este momento, los máximos se alcancen a tiempos mas cortos (días 26-29), puede significar la existencia de un drenaje mas rápido a través de la placenta, bien de la glicerina misma o de productos derivados, lo que está de acuerdo además, con el hecho de coincidir con la etapa de máximo crecimiento fetal. Por otra parte, la incorporación específica relativa que aumenta a medida que progresa la gestación y alcanza su valor máximo el día 26, que se corresponde con el mínimo de cantidad de triglicéridos en el suero (apartado 3.1), disminuye luego bruscamente para alcanzar el día 29 un valor incluso inferior al control. El día 30 de gestación siguen disminuyendo los niveles de incorporación, observandose además, que ya no existe un máximo definido a la media hora de la inyección sino que los valores son practicamente idénticos a los que existen a una hora; es decir, parece existir una tendencia hacia el estado normal (control), lo que, por otra parte es lógico ya que el día 30 es muy próximo al alumbramiento y cabe pensar en la existencia de una autonomia metabólica por parte del feto.

Con respecto a la incorporación de glicerol en fosfolípidos de suero de conejas gestantes, se origina un fuerte incremento en la actividad específica, con respecto a los animales control, que es máxima el día 21 de gestación. Salvo en el día 21 que se produce un descenso rápido a partir de la media hora siguiente a la inyección, en los demás días, a partir de este tiempo, se alcanzan unos niveles de actividad practicamente estables y sin diferencias apreciables hasta el final de la gestación (días 26-29).

En la figura 30 se representan actividades específicas y niveles, tanto de triglicéridos como de fosfolípidos, en suero de animales gestantes y fetos a término, correspondientes a una inyección de glicerol-2-³H. Por lo que se refiere a los niveles o cantidades, son muy superiores en suero fetal, tanto en triglicéridos como en fosfolípidos, sin embargo, las actividades específicas varían de forma diferente:

- Los triglicéridos fetales exhiben una mayor actividad es
pecífica.
- Los fosfolípidos apenas presentan variación.

Estas relaciones materno-fetales se refieren a los resultados obtenidos a las dos horas de la inyección del precursor radiactivo; a este tiempo las madres y sus fetos correspondientes son sacrificados tomándose muestras de las sangres respectivas.

Los niveles tan elevados de triglicéridos fetales e incluso de su actividad específica, tiene que explicarse en función de un intenso transporte a través de la placenta, de productos isotópicamente marcados que pueden ser: glicerina, glicerofosfato o productos de hidrólisis de lípidos mas o menos complejos, en la placenta; lo que estaria de acuerdo con la existencia de un drenaje mas rápido, via placenta durante los últimos días del desarrollo intrauterino. No puede excluirse tampoco la posibilidad de que este intenso drenaje fuese de productos gluconeogénicos formados a partir de la glicerina, lo que estaria de acuerdo con la disminución de los triglicéridos del suero materno que se observa al final de la gestación, en tanto que , en las etapas pre
vias de la misma, la glicerina se incorporaria, fundamentalmente a triglicéridos.

Por lo que se refiere a los fosfolípidos, el hecho de que sus niveles en suero fetal son muy superiores a los del materno, en tanto que las actividades específicas son del mismo orden, su
giere tambien la existencia de una síntesis a partir de precurso

res maternos en la misma línea que la señalada en el caso de los triglicéridos. Por lo que respecta a las clases de fosfolípidos de suero, la incorporación mayor corresponde a LPC y PC, tanto en suero materno como en fetal y al igual que ocurre con los fosfolípidos totales, la incorporación específica en estas dos clases de fosfolípidos es similar en ambos sueros. Por otra parte, la relación PC materna/PC fetal es casi idéntica a LPC materna/LPC fetal, lo que parece inferir la actuación de idénticas o muy similares actuaciones enzimáticas en ambos casos, posiblemente a través de la actuación de la lecitín-colesterol-aciltransferasa (LCAP).

Por último en cuanto a los lípidos de hígado (tabla VI), la incorporación específica en triglicéridos es mayor en hígado materno (casi el doble), que en hígado fetal, mientras que la incorporación en fosfolípidos es ligeramente mayor en hígado fetal. Las incorporaciones mayores corresponden a PC y PE; a diferencia de lo que ocurre con los lípidos de suero, la incorporación en LPC es muy pequeña.

TABLA VI

TEJIDO	"INCORPORACION ESPECIFICA RELATIVA"			
	TG	PL _{totales}	PC	PE
Hígado madre	3,49	2,65	2,06	1,44
Hígado feto	1,81	2,44	2,24	1,74

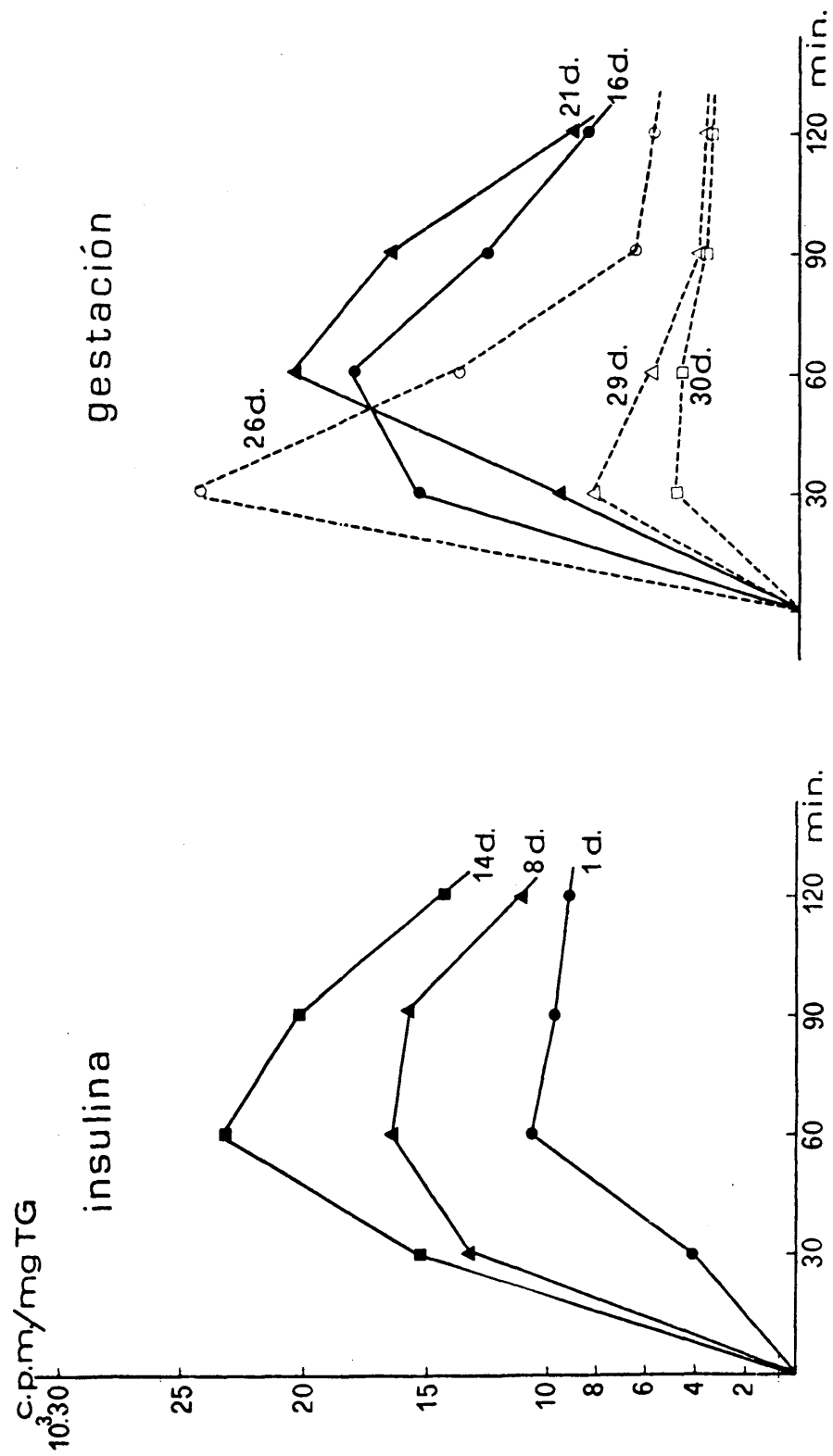


Fig.29. Incorporación de glicerina-2- ^3H en triglicéridos de suero de conejas tratadas con insulina y conejas gestantes. En cada gráfica se indican días de tratamiento con la hormona y días de gestación.

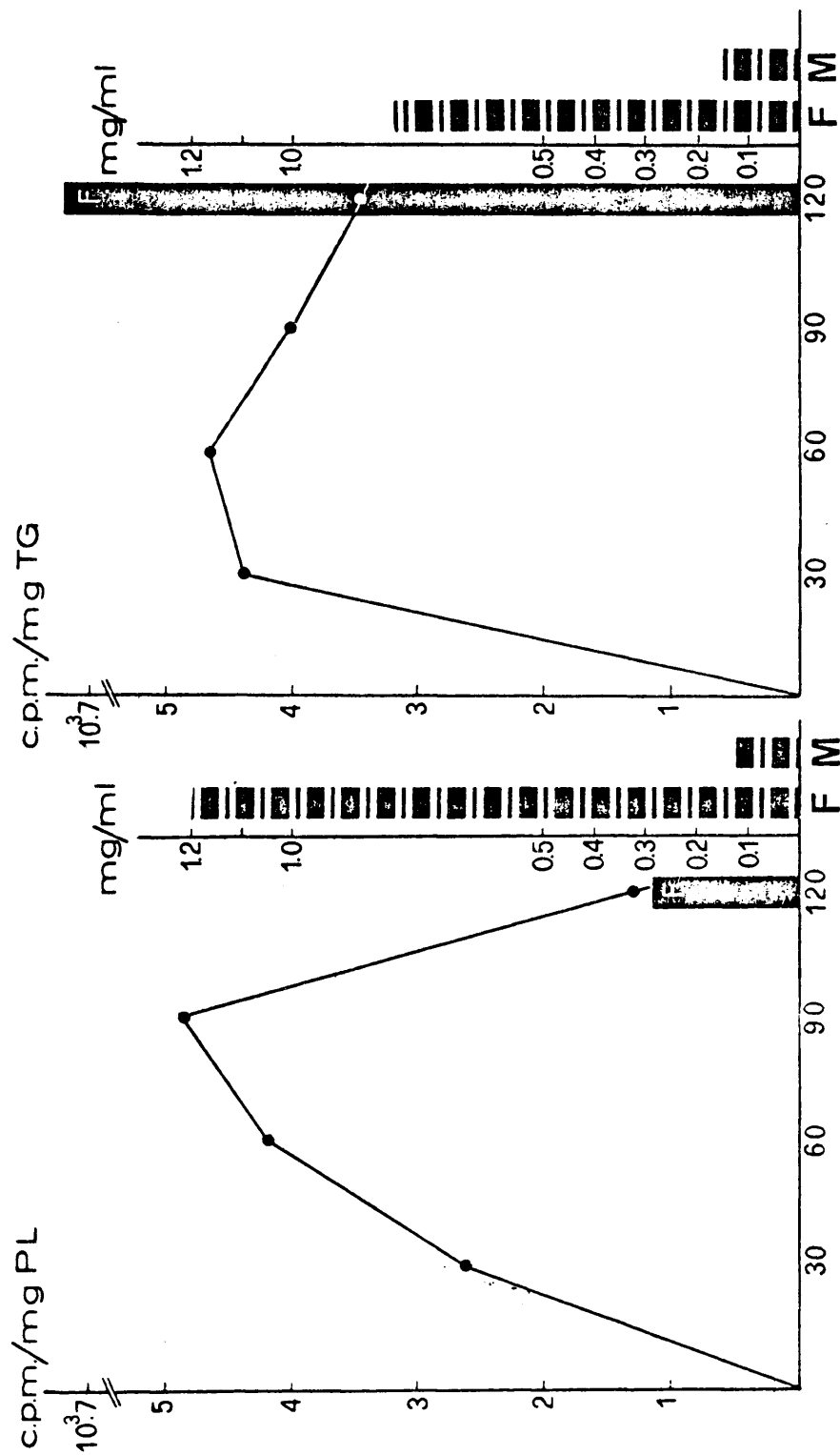


Fig.30. Incorporación de glicerina-2- ^3H en fosfolípidos y triglicéridos de suero de conejas gestantes y feto a término. M=suero materno. F=suero fetal.

3.7 INCORPORACION DE ACIDOS GRASOS POR HOMOGENEIZADOS DE HIGADO DE CONEJAS CONTROL, GESTANTE Y FETO.

En la figura 31 se expresan los resultados obtenidos al estudiar la incorporación de diferentes ácidos grasos utilizados como precursores radiactivos a clases de lípidos en hígado de coneja control, gestante y feto. Se considera como 100% la radiactividad puesta en forma de ácido graso libre $1-^{14}\text{C}$, y el tanto por ciento indicado en cada caso es la cantidad incorporada a la totalidad de clases de lípidos.

Se observa que, utilizando como preparado enzimático el homogeneizado total de hígado de conejas control, la incorporación obtenida es baja, siendo la mayor la correspondiente al ácido 18:1 que llega a ser de un 22%. Cuando se utilizan homogeneizados correspondientes a hígados de conejas gestantes la incorporación es pequeña y constante cuando se utilizan ácidos grasos saturados, para aumentar considerablemente cuando los precursores utilizados son los ácidos grasos insaturados 18:1 y 18:2.

Utilizando homogeneizados de hígado de feto, la incorporación es también baja y se mantiene en unos niveles muy parecidos en los tres ácidos de longitud mas corta (8:0, 10:0, 12:0), para aumentar considerablemente de valor cuando se utiliza como precursores radiactivos los ácidos 14:0 y 16:0. En cuanto a la incorporación de los tres ácidos grasos de 18 átomos de carbono, desciende marcadamente cuando se parte del saturado, para recuperar de nuevo los niveles de incorporación con la insaturación de este, tanto con el 18:1 como con el 18:2.

Estudiando comparativamente la incorporación correspondiente a los tres tejidos estudiados, se deduce que esta es siempre mayor en el hígado fetal que en el adulto, tanto control como gestante. Además, el comportamiento de los tejidos adultos difiere entre si notablemente, siendo la incorporación a clases de lípidos, obtenida con hígado de conejas gestantes mas similar a la del

hígado fetal que al control, sobre todo en el caso de los ácidos grasos insaturados.

En la tabla VII aparecen los datos relativos a la incorporación de la serie de ácidos grasos estudiados en Acil-CoA, DG, TG y PL y a la fracción que permanece como ácidos grasos libres, en cada uno de los homogeneizados de hígado ensayados. Los valores de esta incorporación están de acuerdo, en general, con la composición de ácidos grasos de TG y PL hepáticos (ver apartado 3.2); por ejemplo las diferencias de incorporación de 16:0 y 18:0 en TG, por homogeneizados de hígado fetal, se comprenden con la notable diferencia relativa de sus niveles; de la misma manera, la incorporación de 18:0 y 18:1 en PL de hígado de animales gestantes, co rre paralela a su diferente presencia en esta clase de lípidos.

TABLA VII

Incorporación de ácidos grasos 1-¹⁴C en lípidos (%)

TEJIDO	ACIDO	TG	AGL	Acil-		
	GRASO 1- ¹⁴ C			CoA	DG	PL
Hígado control		3,2	25,2	30,7	29,5	11,4
Hígado gestante	6:0	1,1	27,0	4,2	65,5	5,1
Hígado feto		1,0	19,0	2,1	76,1	1,7
Hígado control		1,0	91,0	4,2	1,8	2,0
Hígado gestante	8:0	0,5	88,5	5,2	3,1	2,6
Hígado feto		7,9	83,7	3,3	2,9	12,2
Hígado control		1,3	87,8	3,3	1,8	5,8
Hígado gestante	10:0	1,0	89,5	2,3	1,8	5,5
Hígado feto		9,6	81,0	2,0	3,9	3,5
Hígado control		13,7	76,3	1,8	1,7	6,5
Hígado gestante	12:0	2,2	86,8	4,8	2,1	4,3
Hígado feto		16,0	68,9	3,3	4,2	7,6
Hígado control		2,7	83,6	3,3	2,6	7,8
Hígado gestante	14:0	1,8	89,1	3,1	1,7	4,3
Hígado feto		42,3	35,7	1,1	9,1	11,8
Hígado control		25,0	46,6	2,4	17,8	8,3
Hígado gestante	16:0	1,6	89,6	2,5	1,7	4,6
Hígado feto		34,4	30,0	1,3	8,9	25,3
Hígado control		0,9	55,7	3,7	19,3	20,3
Hígado gestante	18:0	0,9	90,1	3,9	2,6	2,5
Hígado feto		1,1	79,3	2,3	3,1	14,2
Hígado control		3,8	77,3	2,4	5,7	10,8
Hígado gestante	18:1	2,6	35,2	4,5	29,3	28,4
Hígado feto		10,9	40,0	2,3	14,3	32,5
Hígado control		1,3	85,6	1,7	3,8	7,5
Hígado gestante	18:2	0,9	55,7	3,7	19,3	20,3
Hígado feto		5,2	26,2	2,0	32,7	33,8
Hígado control		1,2	10,2	0,9	19,5	68,3
Hígado gestante	Acetato	1,4	3,4	0,7	14,1	80,4
Hígado feto		1,5	4,0	4,4	11,1	79,0

Podría ocurrir que los datos de incorporación anteriormente expuestos vinieran influidos por las enzimas que catalizan la formación de ésteres de CoA para activar los ácidos grasos. Haciendo ensayos de medida de actividad de las acil-CoA ligasas, se comprueba que las acil-CoA esteres formados por homogeneizados de hígado de conejas y fetos, se mantienen entre un 2 y un 4% con respecto al total de los lípidos formados. Estos valores, tratándose de unos intermediarios metabólicos, son más que suficientes para lograr una buena movilización de estos ácidos grasos.

Utilizando como precursor radiactivo acetato- $1-^{14}\text{C}$ se obtiene una incorporación muy baja (menor al 0,01%), lo cual parece, en principio, estar en contradicción con la aceptable incorporación obtenida al utilizar acetil-CoA como precursor isotópico, en otros trabajos realizados en nuestro laboratorio. Estos resultados pudieron ser explicados por los estudios realizados sobre la actuación de la acetil-CoA ligasa, los cuales han demostrado que la actividad de esta enzima en los tejidos estudiados es prácticamente nula. Es interesante destacar que, pese a la baja incorporación obtenida a partir de acetato, esta aparece exclusivamente en fosfolípidos (tabla VII).

Dado que la máxima incorporación en clases de lípidos, de los ácidos grasos usados como precursores, y que se han considerado ya globalmente en la figura 31, se produce en triglicéridos y fosfolípidos permaneciendo muy baja y con valores muy similares en las restantes clases, se procede en la figura 32 a un estudio comparativo de la incorporación de triglicéridos y fosfolípidos por homogeneizados de hígados de coneja control, y gestante y feto, considerando como 100% la suma de ambas.

Se puede observar que existe una acusada tendencia de los homogeneizados de los hígados de coneja control y gestante a incorporar los precursores marcados preferentemente a fosfolípidos, mientras que, en el hígado fetal esta tendencia solo se observa en los ácidos grasos de mayor longitud de cadena así como en los

insaturados utilizados (18:0, 18:1 y 18:2). Los restantes ácidos grasos se incorporan preferentemente a triglicéridos.

Es también de destacar el hecho de que la elevada incorporación de ácidos grasos insaturados, observada en la figura 31, correspondiente a coneja gestante y feto se produce casi exclusivamente en fosfolípidos, según se deduce en la figura 32. Esto está de acuerdo con la hipótesis de otros investigadores de que los ácidos grasos insaturados se incorporan preferentemente a fosfolípidos.

Para estudiar la posible actuación de los sistemas de elongación y desaturación de los ácidos grasos existentes, en los tejidos estudiados, se analizaron por radiocromatografía de gases los ácidos grasos procedentes de las diferentes incubaciones que utilizan los diferentes ácidos grasos como precursores radiactivos.

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir la no actuación de estos sistemas enzimáticos, ya que durante el periodo de incubación no se produce ninguna transformación de estos ácidos grasos precursores. No obstante es posible que se pueda estudiar la actividad de estos sistemas enzimáticos en otros medios de incubación diferentes del estudiado por nosotros.

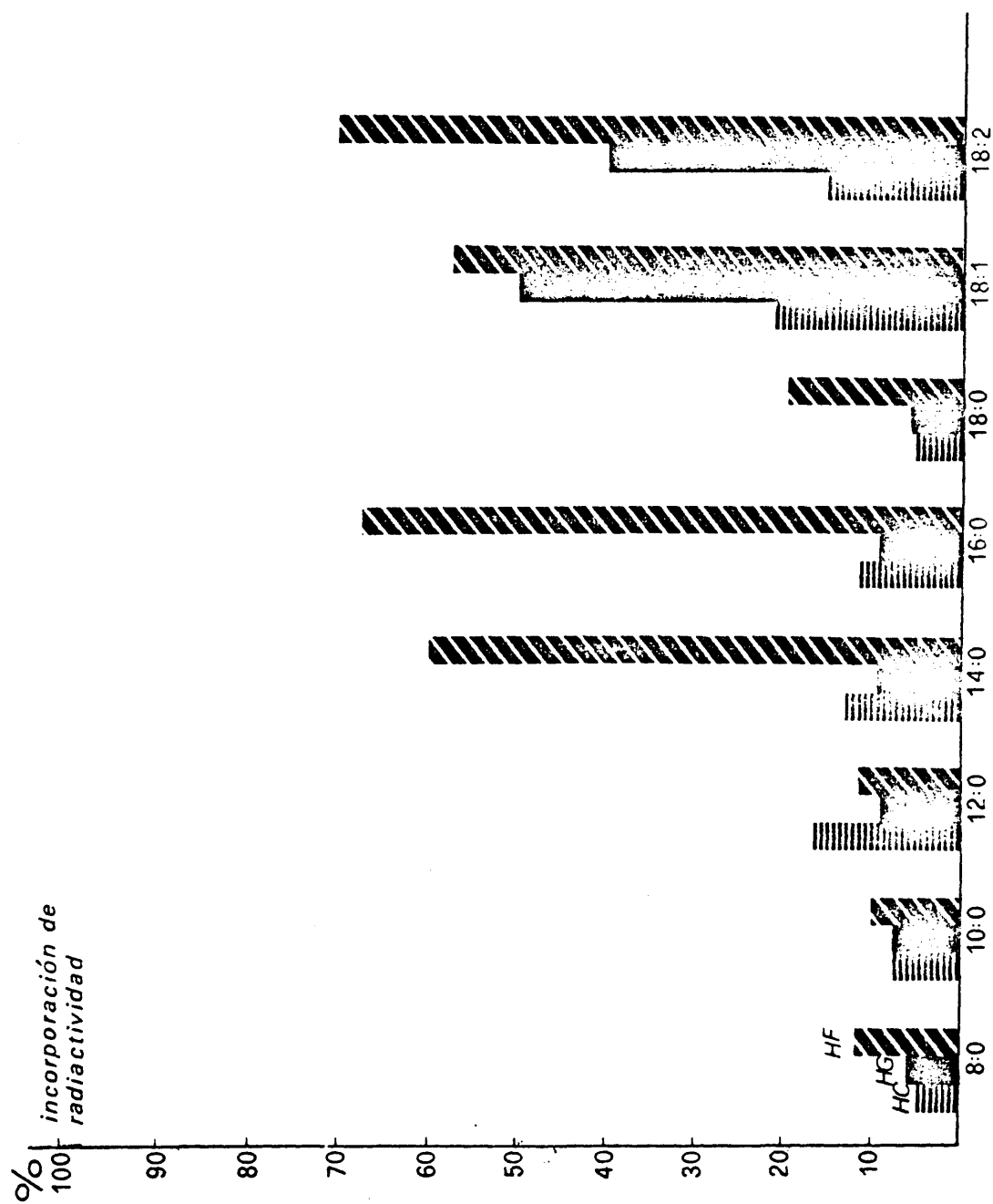


Fig.31. Incorporación de ácidos grasos- ^{14}C a lípidos totales de hígado. HC=hígado conejas control. HG=hígado conejas gestantes. HF=hígado fetal.

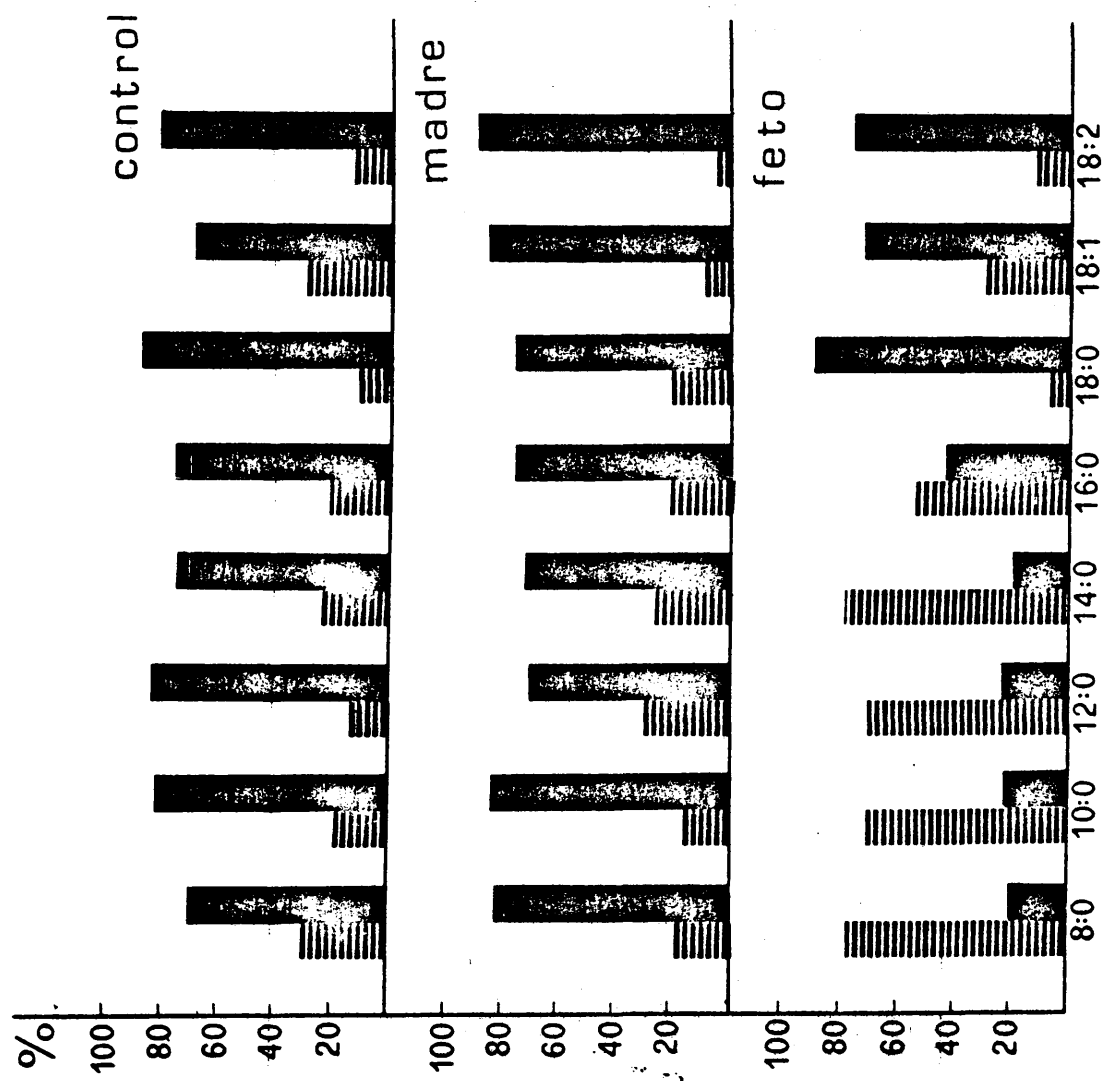


Fig.32. Incorporación de ácidos grasos- $1-^{14}\text{C}$ a triglicéridos y fosfolípidos de hígado. Los resultados se expresan en porcentajes relativos a la suma de ambos. Barras rayadas=triglicéridos. Barras negras=fosfolípidos.

4. CONCLUSIONES.

4 RESUMEN Y CONCLUSIONES

El conjunto de los trabajos realizados acerca del metabolismo y composición de los lípidos en conejos, objeto de esta memoria, se puede resumir en los siguientes puntos:

- Estudio de los niveles de lípidos plasmáticos. Modificaciones producidas por la gestación y la administración continuada de insulina.
- Características estructurales de los lípidos de hígado en conejos adultos control, tratados con insulina, gestantes, y fetos, desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo de sus ácidos grasos constituyentes.
- Estudios sobre distribución posicional de ácidos grasos en fosfolípidos de hígado y pulmón en los mismos grupos de animales.
- Cinética de triglicéridos y fosfolípidos plasmáticos, "in vivo" en conejos adultos control, tratados con insulina y gestantes.
- Estudios "in vitro" sobre la incorporación de determinados ácidos grasos en hígado de conejos adultos y fetos. Influencia de la gestación.

y de los resultados obtenidos en la investigación de estos puntos se establecen las conclusiones que a continuación se señalan:

- 1.- La gestación induce notables variaciones en los niveles de lípidos de suero: los niveles de triglicéridos que se elevan desde el principio de la gestación, alcanzan sus valores máximos alrededor de los días 20-21 de la misma para descender bruscamente en los días siguientes y hasta el término. Esta disminución de los triglicéridos plasmáticos maternos en la segunda parte de la gestación se ha relacionado con un mayor requerimiento, en dicha etapa, de metabolismos maternos por parte del feto, durante el periodo de su máximo crecimiento.

Los niveles de ácidos grasos libres se incrementan paulatinamente desde el comienzo hasta el final de la gestación.

Por el contrario los fosfolípidos sufren un descenso continuado a lo largo de todo el periodo, disminución que afecta primordialmente a la fosfatidilcolina. Además la concentración de fosfolípidos en suero fetal a término es singularmente diferente de la de suero materno, presentando en conjunto niveles mucho mas elevados que afectan fundamentalmente a la fosfatidilcolina y esfingomielina.

Los niveles de colesterol total manifiestan también un descenso continuado desde el comienzo hasta el final de la gestación.

En cuanto a las lipoproteínas de suero, la gestación induce un incremento relativo de las pre- β -lipoproteínas. Por otra parte el descenso de las lipoproteínas α y β , durante dicho periodo sugiere que la disminución en los niveles de fosfolípidos y colesterol puede ser debido a una mayor utilización de estos metabolitos por los tejidos extrahepáticos y es posible que exista una transferencia de estos lípidos maternos al feto.

- 2.- Con respecto a la administración continuada de insulina no afecta los niveles de la mayoría de los lípidos de suero. Unicamente se modifican los ácidos grasos libres, ya que si bien la gestación induce un incremento en los niveles de dichos compuestos, cuando se administra insulina se observa un ligero descenso que debe ser consecuencia de los efectos extrahepáticos de la hormona, es decir de su acción antilipolítica sobre el tejido adiposo. Por otra parte, la administración prolongada de la hormona provoca un incremento en la relación α /pre- β lipoproteínas.

- 3.- Del estudio de la composición de ácidos grasos de los lípidos hepáticos se deduce que la gestación induce cambios que se traducen fundamentalmente en un incremento relativo de ácido palmítico y una disminución de esteárico y linoleico; cambios que son debidos a las variaciones en la composición de ácidos grasos de triglicéridos y fosfolípidos; los triglicéridos son responsables de los cambios en las concentraciones relativas de los ácidos grasos saturados, mientras que los fosfolípidos lo son del insaturado. En los animales adultos los ácidos grasos constituyentes de triglicéridos son mas saturados que los de los fosfolípidos.

 - 4.- Los fosfolípidos de hígado fetal presentan un valor muy bajo del grado de insaturación, inferior al de los triglicéridos del mismo origen. Su característica principal es la baja proporción de ácidos grasos poliinsaturados linoleico y araquidónico. La composición de los triglicéridos del hígado fetal es mas similar a la de un adulto control que a la del hígado materno.

 - 5.- El estudio de la distribución de ácidos grasos entre las posiciones 1 y 2 de fosfatidilcolina de hígado, muestra que no se vé afectada por la gestación. Por otra parte, la relación de ácidos grasos saturados localizados en la posición 1 a los de la posición 2, es notablemente menor en hígado fetal que en hígado materno.
- En fosfatidilcolina de pulmón, la relación entre las posiciones de ácido palmítico presentes en la posición 1 a las de la posición 2 es menor que en hígado tanto en conejas gestantes como en controles. Esto puede interpretarse en relación a la presencia en pulmón de agentes activos de superficie que son, fundamentalmente, lecitinas que poseen palmítico en su posición 2 (dipalmitoil-lecitinas), cuya síntesis transcurre mediante un ciclo de desacilación-reacilación, al contra

rio de las lecitinas hepáticas cuya síntesis transcurre primordialmente mediante un mecanismo "de novo".

- 6.- En cuanto a la distribución de ácido palmítico en fosfatidilcolina de hígado y pulmón de fetos a término es prácticamente idéntica en ambos tejidos y similar a la del pulmón adulto. Esto parece estar relacionado con el hecho de que el feto de conejo sintetiza al término de la gestación grandes cantidades de dipalmitoil-lecitina que son liberadas a los espacios alveolares con el comienzo de la respiración.

- 7.- La distribución de ácidos grasos en fosfatidiletanolamina de pulmón no se afecta por la gestación; sin embargo en la de hígado se observa un descenso en la relación posición 1/posición 2 para los saturados 16:0 y 18:0 y los insaturados 18:1 y 18:2, debido, respectivamente, a un aumento de sus proporciones en la posición 2 y a un descenso en las de la posición 1. Por otra parte de los resultados obtenidos en la distribución de ácido palmítico en fosfatidiletanolamina de pulmón fetal se deduce el predominio de un mecanismo "de novo" en la biosíntesis de este fosfolípido, en lugar de una acilación del lisoderivado correspondiente, como ocurría en la fosfatidilcolina.
Es de destacar la presencia en fosfatidiletanolaminas de hígado y pulmón fetales de ácidos grasos insaturados de cadena larga, localizados, exclusivamente, en la posición 2 de este fosfolípido.

- 8.- En hígado la gestación provoca una mayor especificidad en la localización de ácido palmítico en la posición (1+3) y de los ácidos insaturados oleico y linoleico en la posición 2 de los triglicéridos. En pulmón, sin embargo, la gestación induce una menor especificidad en la distribución parcial de ácidos grasos en triglicéridos. Esta tendencia a igualar la distribución de

ácidos grasos entre ambas posiciones se manifiesta también en triglicéridos de pulmón fetal, cuya distribución parcial de ácidos grasos es muy similar a la de los triglicéridos de hígado fetal y de pulmón materno. Estos resultados ponen de manifiesto la existencia en hígado de un mecanismo de síntesis de triglicéridos que posee diferente especificidad respecto a sus ácidos grasos constituyentes.

- 9.- En ningún caso la insulina, en las condiciones de experimentación, indujo cambios ni en la composición de ácidos grasos de lípidos de tejidos ni en la distribución posicional de los mismos en las diferentes fracciones lipídicas estudiadas.
- 10.- La incorporación de Glicerol-2-³H "in vivo" en triglicéridos de suero muestra un máximo a 1 hora de la inyección del precursor en conejos adultos y controles. Durante la gestación se produce un desplazamiento de dicho máximo a media hora de la inyección, que tiene lugar el día 26 de gestación; asimismo la incorporación es máxima en este día.
Estos hechos sepueden relacionar con la existencia de un drenaje mas rápido a través de la placenta de metabolitos maternos durante el periodo de máximo crecimiento fetal. Este desplazamiento del máximo hacia tiempos mas cortos continúa hasta el término de la gestación, si bien los niveles de incorporación disminuyen notablemente a partir del día 26.
- 11.- A las 2 horas de la inyección del glicerol tritiado, y en el término de la gestación, los niveles de triglicéridos y fosfolípidos son muy superiores en el suero fetal respecto al materno y con respecto a las actividades específicas, los triglicéridos fetales exhiben una mayor actividad que los maternos, en tanto que, los fosfolípidos maternos y fetales presentan actividades es-

pecíficas similares; estos hechos deben explicarse en función del intenso transporte a través de la placenta de productos isotópicamente marcados.

- 12.- La incorporación de glicerol radiactivo en triglicéridos de suero de conejas tratadas con insulina es máxima 1 hora después de la inyección del precursor, como en el caso de las conejas control; sin embargo el nivel de dicha incorporación aumenta a medida que avanza el tratamiento con la hormona, siendo además las variaciones mas bruscas, en el tiempo, que las que ocurren en los animales de referencia.
- 13.- Con respecto a la incorporación de glicerol en fosfolípidos de suero, no se observa un máximo definido en ninguno de los 3 tipos de animales estudiados, por el contrario la incorporación tiene lugar de forma creciente y continuada desde la primera media hora después de la inyección y hasta las 24 horas.
En los animales a los que se les ha administrado insulina se observa, sin embargo, un incremento muy ligero de incorporación con respecto a los controles. Por último, en los animales gestantes se origina un fuerte aumento en la actividad específica, que es máxima el día 21 de gestación.
- 14.- Los estudios realizados "in vitro", con homogeneizados de hígado de conejas control, gestante y feto, sobre la incorporación de ácidos grasos radiactivos a diferentes clases de lípidos, pone de manifiesto que el nivel de ésta es siempre mayor en hígado fetal que en el adulto, ya sea control o gestante. Por otra parte, el comportamiento de los tejidos adultos difiere, entre si, notablemente, siendo la incorporación de los precursores marcados a diferentes lípidos, obtenida con el hígado de conejas gestantes más similar a la del hígado

gado fetal que a la del hígado adulto, sobre todo en lo que se refiere a ácidos grasos insaturados.

- 15.- Existe una tendencia acusada en los homogeneizados de hígado de conejas control y gestante, para incorporar los precursores marcados preferentemente a los fosfolípidos, mientras que con el hígado fetal esta tendencia sólo se observa para los ácidos grasos de cadena mas larga y para los insaturados (18:0, 18:1 y 18:2); los restantes ácidos grasos son incorporados fundamentalmente a triglicéridos.
- 16.- En ensayos realizados de actividades enzimáticas se puso de manifiesto una actividad considerable para las acil-CoA ligasas mientras que la correspondiente a acetil-CoA ligasa es practicamente nula.

5. BIBLIOGRAFIA.

5. BIBLIOGRAFIA

- AARSKOG,D., en "Clinical and Cytogenetic studies in hyposadias".
Wilkins Sym., Baltimore, Maryland (1969)
- ABRAHAM,S., Amer J. Clin. Nutr., 23, 1120 (1970)
- ADAM,P.A.J., TERRANO,K., RAIHA, N., Proc. 78th Annual Meeting of
American Pediatric Society, Atlantic City (1968)
- AKESSON,B., ELOVSON,J., ARVIDSON,G., Biochim. Biophys. Acta, 210
15 (1970a)
- AKESSON,B., Biochim. Biophys. Acta, 218, 57 (1970)
- ALCINDOR,L.G., INFANTE,R., SOLER-ARCILAGA,G., POLONOWSKI,J., Bio
chim. Biophys. Acta, 306, 347 (1973)
- ALEXANDER,D.P., BRITTON,H.G., Foetal Anton Ciba Found. Symp., 95,
(1968a); y J. Physiol., London 196, 27P (1968b)
- ALEXANDER,D.P., BRITTON,H.G., COHEN,N.M., NIXON,D.H., Biol. Noe
nat., 14, 178 (1969)
- ALLRED,J.B., ROEHRIG,K.L., J. Biol. Chem., 248, 4131 (1973)
- ANGEL,A., DESAI,K.S., HALPERIN,M.L., J. Lipid. Res., 12, 203
(1971)
- APPLEMAN,M.M., THOMPSON,W.J., RUSSELL,T.R., en Advances in Cy-
clic Nucleotide Research, Vol. 3, ed por P. Greengard
y G. A. Robison, Raven Press, New York, p. 65 (1973)
- ARTOM, M., Fed. Proc., 27, 457 (1968)
- ASSMANN,G., KRAUSS, R.M., FREDRICKSON,D.S., LEVY,R.I., J. Biol.
Chem., 248, 1992 (1973)
- BAR,H.P., HECHTER,O., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 63, 350 (1969)
- BAKER,N., SCHOTZ,M.C., J.Lipid Res., 8, 646 (1967)
- BAR-ON,H., KOOK,A.I., STEIN,O., STEIN,Y., Biochim. Biophys. Acta,
306, 106 (1973)
- BARAONA,E., LIEBER,C.S., J. Clin. Invest., 49, 769 (1970)
- BARNES,C.G., en Medical Disorders in Obstetric Practice. ed. Blac
kwell Oxford. (1965)
- BARTER,P.J., J. Lipid Res., 15, 11 (1974)
- BASSET,J., J. Endocrinology, 50, 59 (1971)

- BEALL, J.R., Amer. J. Obst. Gyn., 115, 564 (1973)
- BEARN, J.G., ANTONIS, A., PILKINGTON, T.R.E., J. Endocrinology, 37, 479 (1967)
- BEARN, J.G., KOERSELMAN, J.B., PILKINGTON, T.R.E., Nature, 189, 318 (1961)
- BENGTTSSON, L.P., EJARKE, P.M., Acta Obstet. Gynec. Scand., 43, 49 (1964)
- BENJAMIN, F., GASPER, D.J., Amer. J. Obst. Gyn., 94, 566 (1966)
- BERGHER, E., KAUNITZ, H., JOSEPH, J., Obst. Gyn., 24, 909 (1964)
- BEWSHER, P.D., TARRANT, M.E., ASHMORE, J., Diabetes, 15, 346 (1966)
- BIEZENSKI, J.J., KIMMEL, B., Proc. Soc. Exp. Biol., 130, 1238 (1969)
- BIEZENSKI, J.J., CARROZZA, J., LI, J., Biochim. Biophys. Acta, 239, 92 (1971)
- BIEZENSKI, J.J., J. Lipid Res., 3, 120 (1962)
- BIRNBAUMER, L., SUTHERLAND, E.W., J. Biol. Chem., 244, 3468 (1969)
- BJERVE, K.S., FEBS Lett, 17, 14 (1971)
- BJERVE, K.S., Biochim. Biophys. Acta., 270, 348 (1972)
- BJERVE, K.S., Biochim. Biophys. Acta, 296, 549 (1973a)
- BJERVE, K.S., Biochim. Biophys. Acta, 306, 396 (1973b)
- BJORNSTAD, P., BREMER, J., J. Lipid Res., 7, 38 (1966)
- BLEICHER, S.J., O'SULLIVAN, J.B., FREINKEL, N., New Eng. J. Med., 271, 866 (1974)
- BLIGH, E.G., DYER, K.J., Can. J. Biochem Physiol., 39, 911 (1959)
- BLOOMFIELD, D.K., BLOCH, K., J. Biol. Chem., 235, 337 (1960)
- BODY, D.R., GRAY, G.M., Chem. Phys. Lipid, 1, 254 (1967)
- BODY, D.R., SHORLAND, F.B., GASS, J.P., Biochim. Biophys. Acta, 125, 207 (1966)
- BORER, R.C., GLUCK, L., FREEMAN, R.K., KULOVICH, M.V., Pediat. Res., 5, 655 (1971)
- BREMER, J., GREENBERG, D.M., Biochim. Biophys. Acta, 46, 205 (1961)
- BRICKER, L.A., LEVEY, G.S., J. Biol. Chem., 247, 4914 (1972)
- BRISSON, G.R., MALAISE, LAGAE, F., MALAISE, W., J. Clin Invest., 51, 232 (1972)
- BRO-RASMUSSEN., BUUS, O., LUNDWALL, F., Acta Endocr., 40, 571 (1962)
- BROSTROM, C.O., CORBIN, J.D., KING, C.A., KREBS, E.G., Proc. Nat. Acad Sci. USA, 68, 2444 (1971)

- BRYSON, M.J. GABERT, H.A., STENCLIVER, M.A., Amer. J. Obst. Gyn., 114, 208 (1972)
- BUTCHER, R.W., BAIRD, C.E., SUTHERLAND, E.W., J. Biol. Chem., 243, 1705 (1968)
- BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W., J. Biol. Chem., 237, 1244 (1962)
- CAVALLI, D., Quad. Clin. Obst. Gin., 20, 427 (1965)
- CEDARD, L., Steroids, 16, 361 (1970)
- CLAUSEN, J., LOU HOC., ANDRESON, H., J. Neurochem., 12, 599 (1965)
- CONNOR, W.E., OSBORNE, J.W., MARION, W.L., Proc. Soc. Exptl. Biol Med., 118, 710 (1965)
- CONNOR, W.E., J. Lipid Res. 8, 558 (1967)
- CORBIN, J.D., REIMANN, E.M., WALSH, D.A., KREBS, E.G., J. Biol. Chem., 245, 4849 (1970)
- CORBIN, J.D., BROSTROM, C.O., ALEXANDER, R.L., KREBS, E.G., J. Biol. Chem., 247, 3736 (1972)
- COUTTS, J.R.T., J. Endocrinology, 44, 481 (1969)
- CRYER, A., FOSTER, B., WING, D.R., ROBINSON, D.S., Biochem. J., 132, 833 (1973)
- CSORBA, T.R., MATSUDA, I., KALANT, N., Metab. Clin. Exptl., 15, 262 (1966)
- CUARON, A., GAMBLE, J., MYANT, N.B., J. Physiol., 168, 613 (1963)
- CUNNINGHAM, V.J., ROBINSON, D.S., Biochem. J., 112, 203 (1969)
- CUSHMAN, S.W., HEINDEL, J.J. JEANREANUD, B., J. Lipid Res., 14, 632 (1973)
- CHANG, H.C., SEIDMAN, I., TEEBOR, G., LANE, M.D., Biochem. Biophys. Res. Commun., 28, 682 (1967)
- CHAPMAN, M.J., MILLS, G.L., TAYLAUR, C.E., Biochem. J., 131, 177 (1973)
- CHEZ, R.A., MINTZ, D.H., HUTCHINSON, D.L., Metabolism, 20, 805 (1971)
- CHMERALOVA, M., CHMELAR, M., Eur. J. Biochem., 44, 235 (1974)
- CHUNG, T.H., VAHOUNY, G.V., TREADWELL, C.R., J. Atheroscler. Res., 10, 217 (1969)
- DAAE, L.N.W., Biocin. Biophys. Acta, 270, 23 (1972 a)
- DAAE, L.N.W., FEBS Lett., 27, 46 (1972 b)
- DAAE, L.N.W., Biochin. Biophys. Acta, 306, 186 (1973)
- DANCIS, J., Amer. J. Obst. Gyn., 84, 1749 (1962)
- DANNENBURG, W.N., BURT, R.L., Amer. J. Obst. Gyn., 92, 195 (1965)
- DANNENBURG, W.N., BURT, L.R., LEAKE, N.H., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 115, 504 (1964)

- 178
- DAWES, G.S., J. Physiol., 220, 119 (1972)
- DEGRELLE-CHEIMOL, C.L., Rev. Eur. Etud. Clin. Biol., 15, 1072
(1970)
- DEMERS, L.M., GABBE, S.G., Biochim. Biophys. Acta, 313, 202 (1973)
- DESAI, K.S., LI, K.C., ANGEL, A., J. Lipid. Res., 14, 647 (1973)
- DI AGUSTINI, R.P., Biochem. Biophys. Res. Commun., 43, 311 (1971)
- DILS, R.R., HUBSCHER, G., Biochim. Biophys. Acta, 46, 505 (1961)
- DITTMER, J. C. LESTER, R.L., J. Lipid. Res., 5, 126 (1964)
- DOE R.P., ZINNEMAN, H.H., FLINK, E.B., J. Clin. Endocr. Metab.,
20, 1484 (1960)
- DOLE, V.P., MEINERTH, H., J. Biol. Chem., 235, 2595 (1960)
- DRYDEN, F.D., MARCHELLO, J.A., FIGROID, W.C., HALE, W.H., J. Anim.
Sci., 36, 19 (1973)
- DUPOIS, G., FAVARGER, P., Helv. Physiol. Acta, 21, 300 (1973)
- EATON, R.P., STEINBERG, D., BERMAN, M., J. Clin. Invest., 44, 1042
(1965)
- EATON, R.P., J. Lipid Res., 14, 312 (1973)
- EDLOW, J.B., HUDDLESTON, J.F., LEE, G., Amer. J. Obst. Gyn., 111, 360
(1971)
- EISEMBERG, S., RACHMILEWITZ, D., Biochim. Biophys. Acta, 326, 378
(1973)
- ERBLAND, J.F., MARINETTI, G.V., Fed. Proc., 21, 295 (1962)
- ERBLAND, J.F., MARINETTI, G.V., Biochim. Biophys. Acta, 106, 139
(1965)
- EXTON, J.H., LEWIS, S.B., HO, R.J., ROBISON, G.A., PARK, C.R., Ann N.
Y. Acad. Sci., 185, 85 (1971)
- FABIAN, E., STORK, A., KUCEROVA, L., Amer. J. Obst. Gyn., 100, 904
(1968)
- FAIN, J.N., SOW, R.O., Am. J. Physiol., 210, 19 (1966)
- FAIRWEATHER, D.V.I., J. Obst. Gyn. Brit. Com., 78, 707 (1971)
- FARQUHAR, J.W., GROSS, R.C., WAGNER, R.M., REAVEN, G.M., J. Lipid Res
6, 119 (1965)
- FASSINA, G., Life Sci., 6, 825 (1967)
- FAVARGER, P., GERLACH, J., ROUS, S., FEBS Lett., 2, 289 (1969)
- FERRE, F., CEDARD, L., C. R. Acad. Sci. Paris Ser. D., 274, 2599
(1972)

- FOLCH, J., J. Biol. Chem., 191, 807 (1951)
- FREDRICKSON, D.S., LEVY, R.I., LEES, R.S., New Engl. J. Med., 276, 32, 94, 148, 215, 273 (1967)
- FREDRICKSON, D.S., GOTTO, A.M., LEVY, R.I., en The Metabolic. Basis of Inherited Disease, ed. por J.B. Stanburg, J.B. Wyngaarden y D.S. Fredrickson, Mc. Graw-Hill. New York, p. 499 (1972)
- FREINKEL, N., Diabetes, 13, 260 (1964)
- FROESCH, E.R., GIMSBERG, J.L., J. Biol. Chem., 237, 3317 (1962)
- FROESCH, E.R., en Handbook of Physiology, section 5: Adipose Tissue, Baltimore (1965)
- FROSOLONO, M.F., SLIVKA, S., CHARMS, B.L., J. Lipid Res., 12, 96 (1971)
- GABBE, S.G., Amer J. Obst. Gyn., 114, 540 (1972)
- GARFINKEL, A.S., SCHOTZ, M.C., J. Lipid Res., 13, 63 (1972)
- GARFINKEL, A.S., SCHOTZ, M.C., Biochim Biophys. Acta, 306, 128 (1973)
- GAUTRAY, J.P., en Reproduction Humaine Ed. Masson. Paris (1968)
- GEMZELL, C.A., FILTEJKERSKJOLD, F., STROM, L., J. Clin. Endocr. Metab. 15, 537 (1955)
- GIBSON, K.D., WILSON, J.D., UDENFRIEND, S., J. Biol. Chem., 236, 673 (1961)
- GINSBERG, J.L., Z. Ges. Exptl. Med., 139, 101 (1965)
- GLUCK, L., LANDOWNE, R.A., KULOVICH, M., Pediatr. Res., 4, 352 (1970)
- GLUCK, L., Pediatr. Res., 1, 247 (1967 b)
- GLUCK, L., Pediatr. Res., 1, 237 (1967 a)
- GLUCK, L., Amer J. Obst. Gyn., 109, 440 (1971)
- GLUCK, L., Pediatr. Clin. N.A., 19, 325 (1972)
- GLUCK, L., KULOVICH, M.V., BORER, R.C., BRENNER, P.H., Amer. J. Obst. Gyn., 109, 440 (1971)
- GOLDMAN, P., ALBERTS, A.W., VAGELOS, P.R., J. Biol. Chem., 238, 3579 (1963)
- GONCALVES, J., FAVARGER, P., ROUS, S., Biochimie, 54, 1049 (1972)
- GROSS, R.C., EIGENBRODT, E.M., FARQUHAR, J.W., J. Lipid Res., 8, 114 (1967)
- GUDSON, J.P., WAITE, B.M., Amer. J. Obst. Gyn., 112, 62 (1972)
- GUCHHAIT, R.B., PUTZ, G.R., PORTER, J.W., Arch. Biochem. Biophys., 117, 541 (1966)

- HAFT,D.E., Am J. Physiol., 213, 219 (1967)
- HAJRA,A.K., AGRANOFF,B.W., J. Biol. Chem., 242, 1074 (1967)
- HALL,C.L., BALL,E.G., Biochim. Biophys. Acta, 210, 209 (1970)
- HARADA,N., J. Nutr., 93, 263 (1967)
- HARLAN,W.R., WAKIL,S.J., J. Biol. Chem., 238, 3216 (1963)
- HAVEL,R.J., FELTS,J.M., VAN DUYNE,C.M., J. Lipid Res., 3, 297
(1962)
- HAVEL,R.J., J. Clin. Invest., 49, 2017 (1970)
- HEINBERG,M., WEINSTEIN,I., KOHOUT,M., J. Biol. Chem., 244, 513
(1969)
- HEINZE,E., ESTEINKE,J., Endocrinology, 88, 1259 (1971)
- HENLY,A.A., Analyst., 82, 286 (1957)
- HEPP,K.D., Diabetologia, 1, 484 (1971)
- HERSHFIELD,M.S., NEMETH,A.M., J. Lipid Res., 9, 460 (1968)
- HILL,E.E., HUSBANDS,D.R., LANDS,W.E.M., J. Biol. Chem., 243, 4440
(1968)
- HIMMS-HAGEN,J., Can. J. Biochem., 46, 1107 (1968)
- HIRSH,J., FARQUHAR,J.W., AHREUS,E.M., Amer J. Clin. Nutr., 8, 499
(1960)
- HOLLOWAY,P.W., WAKIL,S.J., J. Biol. Chem., 239, 2489 (1964)
- HOLMAN,R.T., Acta chem. Scand., 17, 80 (1963)
- HOOD,R.L., ALLEN,C.E., J. Nutr., 103, 353 (1973)
- HOWARD,C.F. Jr., LOWENSTEIN,J.M., J. Biol. Chem., 240, 4170
(1965)
- HULSMANN,W.C., DOW,D.C., Biochim. biophys. Acta, 84, 486 (1964)
- HUTTUNEN,J.K., STEIMBERG, D., Biochim. Biophys. Acta, 239, 410
(1971)
- HUTTUNEN,J.K., STEIMBERG,D., MAYER,S.E., Biochem. Biophys. Res.
Commun., 41, 1350 (1970)
- ILLIANO,G.,CUATRECASAS,P., Science, 175, 906 (1972)
- ISRAEL,S.L., STROUP,P.e., SELIGSON,H.T., Obst. Gyn., 14, 68 (1959)
- JANSEN,G.R., ZANETTI,M.E., HUTCHISON,C.F., Biochem. J., 102, 870
(1969)
- JONES,D.P., ARKY,R.A., Metab. Clin. Exptl., 14, 1287 (1965)
- JOSIMOVICH,J.B., Mc. LAREN,J.A., Endocrinology, 71, 209 (1962)
- JOST,A., PICON,L., C.R. Acad Sci., Paris, 246, 1281 (1958)

- JURAND, J., OLIVER, M.F., *Atherosclerosis*, 11, 141 (1970)
- KANFER, J.N., *J. Lipid. Res.*, 13, 468 (1972)
- KANOH, H., OHNO, K., *Biochim. Biophys. Acta*, 306, 203 (1973 a)
- KANOH, H., OHNO, K., *Biochim. Biophys. Acta*, 326, 17 (1973 b)
- KANOH, H., *Biochim. Biophys. Acta*, 176, 756 (1969)
- KANOH, H., *Biochim. Biophys. Acta*, 218, 249 (1970)
- KAPLAN, S.L., GRUNBACH, M.M., *J. Clin. Endocr. Metab.*, 24, 80 (1964)
- KARP, W.B., SPRECHER, H., ROBERTSON, A., *Biol. Neonate*, 18, 341 (1971)
- KARP, W.B., *Diss. Abstr. Int.*, B32, 130 (1971)
- KENNEDY, E.P., *Fed. Proc.*, 20, 934 (1961)
- KESSLER, J.I., STEIN, J., DANNACKER, D., NARCESSIAN, P., *J. Biol. Chem.* 245, 5271 (1970)
- KLEIN, A.W., BECKER, R.F., *Amer. J. Obst. Gyn.*, 115, 842 (1973)
- KLEVIT, H.D., *Pediat. Clin. N. Amer.*, 13, 59 (1966)
- KNIGHT, B.L., ILIFE, J., *Biochem. J.*, 132, 77 (1973)
- KNIGHT, B.L., *Biochem. J.*, 123, 485 (1971)
- KNOPP, R.H., SANDEK, C.D., ARKY, R.A., *Endocrinology*, 92, 984 (1973)
- KO, H., ROYER, M.E., *Anal. Biochem.*, 20, 205 (1967)
- KONO, T., BARHAM, F.W., *J. Biol. Chem.*, 248, 7417 (1973)
- KORNACKER, M.S., LOWENSTEIN, J.M., *Science*, 144, 1027 (1964)
- KOTAS, R.V., AVERY, M.E., *J. Appl. Physiol.*, 30, 358 (1971)
- KRAUSS, R.M., WINDMUELLER, H.G., LEVY, R.I., FREDRICKSON, D.S., *J. Lipid Res.*, 14, 286 (1973)
- LA ROSA, J.C., LEVY, R.I., WINDMUELLER, H.G., FREDRICKSON, D.S., *J. Lipid Res.*, 13, 356 (1972)
- LANDS, W.E., MERKL, I., *J. Biol. Chem.*, 238, 898 (1963)
- LANGDON, R.G., *J. Biol. Chem.*, 226, 615 (1957)
- LANGER, T., BILHEIMER, D., LEVY, R.I., *Circulation*, 42, III-7 (1970)
- LANMAN, J.T., *Pediatrics*, 27, 150 (1961)
- LARON, Z., MANNHEIMER, S., NITZAN, M., *Arch. Dis. Child*, 42, 24 (1967)
- LEMOs de, R.A., SHERMETA, D.W., KUELSON, J.H., KOTAS, R., *Ann. Rev. Respir. Dis.*, 102, 459 (1970)
- LEMOs de, R.A., Mc. LAUGHLIN, G.W., *Pediat. Res.*, 7, 197 (1973)
- LEONE, V., LEONARDIS de, A., PIERRO di, A., *Min. Gyn.*, 10, 276 (1958)
- LINDET, T., BILLEWIZ, W.Z., *J. Obst. Gyn. Brit. Com.*, 80, 1033 (1973)

- LO, C., MARSH, J.B., J. Biol. Chem., 5001 (1970)
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)
- MAJERUS, P.W., ALBERTS, A.W., VAGELOS, P.R., Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 53, 410 (1965)
- MAJERUS, P.W., VAGELOS, P.R., Fed. Proc., 23, 166 (1964)
- MALLOV, S., ALOUSI, A.A., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 119, 301 (1965)
- MANGOLD, H.K., MALINC, D.C., J. Am. Oil. Chem. Soc., 37, 383 (1961)
- MANINNG, R., BRINDLEY, D.N., Biochem. J., 130, 1003 (1972)
- MARCEL, Y.L., SUZUE, J., J. Biol. Chem., 247, 4433 (1972)
- MARGOLIS, S., VAUGHAN, M., J. Biol. Chem., 237, 44 (1962)
- MARSH, J.B., JAMES, A.T., Biochim. Biophys. Acta, 60, 320 (1962)
- MARTIN, J.D., MILLS, I.H., Clin. Sci., 17, 137 (1958)
- MARTIN, D.B., VAGELOS, P.R., en "Handbook of Physiology", Section 5: adipose tissue. Baltimore (1965)
- Mc BRIDE, O.W., J. Lipid. Res., 5, 453 (1964)
- Mc DONALD, H.J., RIBERO, L.P., Clin. Chim. Acta, 4, 458 (1959)
- Mc KAY, D.G., KAUNITZ, H., Metabolism., 12, 990 (1963)
- MENDENHALL, C.L., J. Lipid Res., 13, 117 (1973)
- MENON, K.M.J., GIESE, S., JAFFE, R.B., Biochim. Biophys. Acta, 304, 203 (1973)
- MERSMANN, H.J., UNDERWOOD, M.C., BROWN, L.J., Amer. J. Physiol., 224, 1130 (1973)
- MERSMANN, H.J., PHINNEY, G., SANGUIENETTI, M.C., HOUK, J.M., Comp. Biochem. Physiol., 46B, 493 (1973)
- METCALFE, L.E., SCHMITZ, A.A., Anal. Chem., 33, 363 (1961)
- METZ, S.H.M., MULDER, I., VAN DER BERGH, S.G., Biochim. Biophys. Acta, 306, 42 (1973)
- MILKOVIC, S., MILKOVIC, K., SENCAR, I., PAUNOVIC, J., en "Progress in Brain Research"; ed. por De Wied y Wijnen. Elsevier, Amsterdam; vol. 32, p.71 (1970)
- MILKOVIC, S., MILKOVIC, K., PAUNOVIC, J., Endocrinology, 92, 380 (1973)
- MILNER, R.D.G., LEACH, F.N., ASHWORTH, M.A., Biochim. Biophys. Acta, 304, 225 (1973)
- MILNER, R.D.G., J. Endocrinol., 44, 267 (1969a)

- MILNER,R.D.G., ASHWORTH,M.A., BARSON,A.J., J. Endocrinol., 52, 497
(1972)
- MILNER ,R.D.G., ASHWORTH,M.A., BARSON,A.J., Horm. Metab. Res., 3,
353 (1971)
- MILNER,R.D.G., J. Endocrinol., 43, 119 (1969b)
- MINTZ,D.H., LEVEN,G.S., SCHEN,K.A., Endocrinology, 92, 614 (1973)
- MINTZ,D.H., CHEZ,R.A., HORGER?E.O., J. Clin. Invest., 48, 176
(1969)
- MOOKERJEA,S., Can. J. Biochem., 47, 125 (1969)
- MORIKAWA,Y., EGUCHI, Y., Endocr. Jap., 13, 189 (1966)
- MOSSMAN,H.W., Contrib. to Embryol., 26, 129 (1937)
- MULLICK,S., BAGGA,O., MULLICK,V., Amer. J. Obst. Gyn., 89, 766
(1964)
- MURPHY,B.E.P., CLARKS,S., Amer. J. Obst. Gyn., 118, 538 (1974)
- NAGAI,J., BLOCH,K., J. Biol. Chem., 240, 3702 (1965)
- NARAYAN,K.A., Lipids, 5, 156 (1970)
- NELSON,G.H., Amer. J. Obst. Gyn., 112 827 (1972)
- NESTEL,P.J., Metab. Clin. Exptl., 16, 1123 (1967)
- NESTEL, P.J., AUSTIN,W., Life Sci., 8, 157 (1969)
- NIKKILA,E.A., PIKALISTO,O., 3rd Intern. Sym. Drugs Affecting Lipid
Metabolism, Milán (1968)
- NIKKILA,E.A.,ADV.Lipid Res., 7, 63 (1969)
- NIKKILA,E.A., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 18, 76 (1966)
- NOBLE,R.C., CHRISTIE,W.W., MOORE,J.H., J. Sci. Food Agric., 22,
616 (1971)
- NOBLE,R.C., STEELE,W., MOORE,J.H., Lipids, 6, 26 (1971)
- NUGTEREN,D.H., Biochim. Biophys. Acta, 106, 280 (1965)
- OCKNER,R.K., JONES,A.L., J. Lipid Res., 11, 284 (1970)
- O'HEA,E.K., LEVEILLE,G.A., J. Nutr., 99, 338 (1969)
- PATTEN,R.L,R.L., J. Biol. Chem., 245, 5577 (1970)
- PEARLMAN,W.H., CREPY,O., MURPHY,M., J. Clin. Endocr., 27, 1012
(1967)
- PENHOS,J.C., WU,C.H., LEMBERG.,A., DAUNAS, J. BRODOFF,B., SODERO,
A., LEVINE,R., Metab. Clin. Exptl., 17, 246 (1968)
- PETERSON,R.R., YOUNG,W.C., Endocrinology, 50, 218 (1952)
- PHILLIPS,G.T., NIXON,L.E., DORSEY,J.A., BUTTERWORTH,P.H.W., CHES
TERTON,C.J., PORTER,J.W., Arch. Biochem. Biophys., 138,

- PICARD, C., Bull. Soc. Roy. Belge Gyn. Obst., 37, 277 (1967)
- PICON, L., J. Physiol (Paris), 60, 275 (1968)
- PITKIN, R.M., VAN ORDEN, D.E., Endocrinology, 94, 1247 (1974)
- PLOTZ, E.J., Amer. J. Obst. Gyn., 101, 534 (1968)
- POPJAK, J., J. Physiol., 105, 236 (1946)
- POPJAK, G., Cold. Spring Harbor Sym. Quant. Biol., 19, 200 (1954)
- POPJAK, G., BECKMANS., Biochem. J., 547 (1950)
- PORCELLATI, G., ARIENTI, G., PIROTTA, M., GIORGINI, D., J. Neurochem. 18, 1395 (1971)
- PRATT, J.J., DANGERFIELD, W.G., Clin. Chim. Acta, 23, 189 (1969)
- QUINTO, P., BOTTIGLIONI, F., ORLANDI, C., en "Metabolismo Glicidico e stato puerperale". ed. Capelli, Bologna (1964)
- RAJN, P.K., REISER, R., Biochim. Biophys. Acta, 176, 48 (1969)
- RANDLE, P.J., GARLAND, P.B., NEWSHOLME, E.A., Ann N.Y. Acad. Sci., 131, 324 (1965)
- RANDLE, P.J., Diabetologia, 2, 237 (1966)
- REAVEN, G.M., HILL, D.B., GROSS, R.C., FARQUHAR, J.W., J. Clin. Invest. 44, 1826 (1965)
- REDGRAVE, T.G., J. Clin. Invest., 49, 465 (1970)
- ROBINSON, J., NEWSHOLME, E.A., Biochem. J., 104, 2 c (1967)
- ROBISON, G.A., BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W., en Cyclic AMP Academic Press, N.Y., p. 286 (1971)
- RODBELL, M., BIRNBAUMER, L., POHL, S.L., J. Biol. Chem., 245, 718 (1970)
- ROGERS, C.G., Nutr. Rep. Int., 5, 381 (1972)
- ROGERS, C.G., J. Nutr., 101, 1547 (1971)
- ROTHBLAT, G.H., en Growth Nutrition and Metabolism of Cells In culture, Academic Press, London (1972)
- ROUS, S., AUBRY, L., Bull. Soc. Chim. Biol., 52, 411 (1970)
- ROUSER, G., SIAKOTOS, A.N., FLEISCHER, S., Lipids, 1, 85 (1966)
- ROUX, J.F., ROMNEY, S.L., Amer. J. Obst. Gyn., 97, 268 (1967)
- ROUX, J.F., GRIGORIAN, A., TAKEDA, Y., Nature, 216, 819 (1967)
- ROUX, J.F., Trans. Sixth Roch. Tropho. Conf., p. 205 (1971)
- ROUX, J.F., MYERS, R.E., Amer. J. Obst. Gyn., 118, 385 (1974)
- ROUX, J.F., Metabolim, 15, 856 (1966)

- RUBENSTEIN,B., RUBENSTEIN,D., Can. J. Biochem., 44, 129 (1966)
- RUDEL,L.L., FELTS,J.M., MORRIS,M.D., Biochem. J., 134, 531 (1973)
- RUDERMAN,N.B., RICHARDS,K.C., VALLES DE BOURGES, V., JONES,A.L.,
J. Lipid Res., 9, 613 (1968)
- SALAMAN,M.R., ROBINSON,D.S., Biochem. J., 99, 640 (1966)
- SALERMO,D.M., BEELER,D.A., Biochim. Biophys. Acta, 326, 325
(1973)
- SANDBERG,A.A., SLAUNWHITE,W.R., J. Clin. Invest., 38, 1290 (1965)
- SCOTT,T.W., SETCHELL,B.P., BASSETT,J.M., Biochem. J., 104, 1040
(1967)
- SCOW,R.O., HAMOSH,M., BLANCHETTE,MACKIE,E.J., EVANS,A., J. Lipids
7, 497 (1972)
- SCHWARTZ,J.P., JUNGAS,R.L., J. Lipid Res., 12, 553 (1971)
- SCHWARTZ,J.P., Proc. Roy. Soc. Med. (Suppl.), 61, 123 (1968)
- SEIDMAN,I., HORLAND,A.A., TEEBOR,G.W., Biochim. Biophys. Acta,
146, 600 (1967)
- SIMS,R.P.A., LAROSE,J.A.G., J. Am. Oil. Chem. Soc., 39, 232 (1962)
- SINCLAIR,A.J., Can. J. Biochem., 49, 700 (1971)
- SKIDMORE,W.G., J. Lipid Res., 3, 356 (1962)
- SMITH,B.T., TORDAY,T.S., GIROND,C.P.J., J. Clin. Invest., 53,
1518 (1964)
- SMITH,S.T., ABRAHAM,S., Arch. Biochem., 136, 112 (1970)
- SODOYEZ-GOFFAUX,F., SODOYEZ,J.C., FOA,P.P., Diabetes, 20, 586
(1971)
- SPELLACY,W.N., GOETZ,F.C., GREENBERG, B.Z., Amer. J. Obst. Gyn.,
90, 753 (1964)
- SPELLACY,W.N., BUHI,W.C., Obstet. Gynecol., 39, 852 (1972)
- SPERRY,W.N., en Biochemistry, of Brain. during early development.
Neurochemistry, ed. 2 Thomas, Springfield (1962)
- SPOTO,P., Atti. Soc. It. Ost. Gin., 49, 279 (1962)
- STEINBERG,D., en progress in Biochemical Pharmacology, ed. por D.
Kritchevski, R. Paoletti y D. Steinberg, S. Kargel, Basel
(1967)
- STERNBERG,J., Gynec. et Obstet., 59, 187 (1960)
- STEWART,J.E., SCHOTZ,M.C., J. Biol. Chem., 246, 5749 (1971)
- STOFFEL,W., ACH,K.L., Hoope-Seyler's Z. Physiol. Chem., 337, 123
(1964)

- SUNDLER, R., *Biochim. Biophys. Acta*, 306, 218 (1973)
- SUNDLER, R., AKESON, B., NILSSON, A., *Biochim. Biophys. Acta*, 337, 248 (1974)
- SWEENEY, M.J., ASHMORE, J., *Metab. Clin. Exptl.*, 14, 516 (1965)
- SZABO, A.J., LELLIS de, R., GRIMALDI, R.D., *Amer. J. Obst. Gyn.*, 115, 257 (1973)
- TAENSCH, H.W. Jr., HEITNER, M., AVERY, M.E., *Ann. Rev. Respir. Dis.*, 105, 971 (1972)
- TAKAYASU, K., TADA, T., OKADA, F., YOSHIKAWA, I., *Jap. Circul. J.*, 35, 1059 (1971)
- TREBLE, D.H., FRUMKIN, S., BALINT, J.A., BEELER, D.A., *Biochim. Biophys. Acta*, 202, 163 (1970)
- TZUR, R.T., TAL, E., SHAPIRO, B., *Biochim. Biophys. Acta*, 84, 18 (1964)
- VAGELOS, P.R., *Ann. Rev. Biochem.*, 33, 139 (1964)
- VAGELOS, P.R., MAJERUS, P.W., ALBERTS, A.W., LARRABEE, A.R., AILHAUD, G.P., *Fed. Proc.*, 25, 1485 (1966)
- VAN DEN BOSCH, H., BONTE, H.A., VAN DEENEN, L.L.M., *Biochim. Biophys. Acta*, 98, 648 (1965)
- VAN DEN BOSCH, H., VAN GOLDE, L.M.G., SLOTBOOM, A.J., VAN DEENEN, L. L.M., *Biochim. Biophys. Acta*, 152, 694 (1968)
- VAN DUYNE, C.M., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 102, 599 (1959)
- VAN DUYNE, C.M., *Amer. J. Obst. Gyn.*, 84, 1069 (1962)
- VAN DUYNE, C.M., *Biol. Neonate*, 9, 115 (1965)
- VAN GOLDE, L.L.G., SCHERPHOF, G.L., VAN DEENEN, L.L.M., *Biochim. Biophys. Acta*, 125, 496 (1966)
- VAUGHAM, M., BERGER, J.E., STEIMBERG, D., *J. Biol. Chem.*, 239, 401 (1964)
- VELASCO, M.S.A., BENJAMIN, F., GORDON, H.H., *Amer. J. Obst. Gyn.*, 96, 930 (1966)
- VEREYKEN, J.M., MONTFOORT, A., VAN GOLDE, L.M.G., *Biochim. Biophys. Acta*, 260, 70 (1972)
- VIKROT, O., *Acta, Med. Scand.*, 53, 175 (1964)
- VILLEE, C.A., LORING, J.M., *Biochem. J.*, 81, 488 (1961)
- VILLEE, C.A., HAGERMAN, D.D., HOLMBERG, N., *Pediatrics*, 22, 953 (1958)
- WAKIL, S.J., PUGH, E.L., SAUER, F., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 52, 106 (1964)
- WAKIL, S.J., *Proc. Int. Congr., Biochem.* 5 th (1961), p.3 (1963)
- WEINHOLD, P.A., *J. Lipid. Res.*, 9, 262 (1968)
- WEST, C.E., PASSEY, R.F., *Biochem. J.*, 102, 58 (1967)

WHITFIELD,C.R., Brit. Med. J. 2, 85 (1972)

WIDDOWSON,E.M., Nature, 166, 626 (1950)

WILLES,R.F., BODA,J.M., Fed. Proc., 27, 496 (1968)

WILLIAMSON,J.R., GARCIA,A., RENOLD,A.E., CAHILL,G.F. Jr., Diabetes, 15, 183 (1966)

WILLES,R.F., BODA,J.M., MANNS,J.G., Endocrinology, 84, 520 (1969)

WINAND,J., FURNELLE,J., CHRISTOPHE,J., Biochim. Biophys. Acta, 152, 280 (1968)

WINDMUELLER,H.G., SPAETH,A.E., Arch. Biochem. Biophys., 122,362 (1967)

WINDMUELLER,H.G., LEVY,R.I., J. Biol. Chem., 243, 4878 (1968)

WINDMUELLER,H.G., HERBERT,P.N., LEVY,R.I., J. Lipid Res, 14, 215 (1973)

WING,D.R., ROBINSON,D.S., Biochem. J., 106, 667 (1968)

Wolfe,B.M.J., AHALT,B., BECK,J.C., RUBINSTEIN,D., Can. J. Biochem. 48, 170 (1970)

YEN,S.S.C., J. Clin. Endocr., 25, 655 (1965)

ZACHMAN,R.D., Abs. Soc. Ped. Res. 39th Annual Meeting, p.40 (1969)

ZACHMAN,R.D., Biol. Neonate, 20, 448 (1972)

ZAK,B., MOSS,N., BOYLE,A.J., ZLATKIS,A., Anal. Chem., 26, 776 (1954)

ZILVERSMIT,D.B., J. Lipid Res., 9, 180 (1968)

ZILVERSMIT,D.B., HUGHES,L.B., REMINGTON,M., J. Lipid Res.,13, 750 (1972)